

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



TESIS DOCTORAL

**Estudio de la calidad seminal del toro de lidia fragmentación del ADN
espermático**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Raquel Posado Ferreras

Directores

José Jaime Gosálvez Berenguer
María del Carmen López Fernández
Marta Hernández Pérez

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria
Departamento de Producción Animal



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LA CALIDAD SEMINAL DEL TORO DE LIDIA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO

Por

Raquel Posado Ferreras

2014

Directores:

José Jaime Gosálvez Berenguer.
M^a del Carmen López Fernández.
Marta Hernández Pérez.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



**ESTUDIO DE LA CALIDAD
SEMINAL DEL TORO DE LIDIA
FRAGMENTACIÓN DEL ADN
ESPERMÁTICO**

Raquel Posado Ferreras

Tesis Doctoral

2014

D. Jose Jaime Gosálvez Berenguer y Dña. Carmen López Fernández, Catedrático y Profesora Titular del Departamento de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid y Dña. Marta Hernández Pérez, Jefa del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León.

INFORMAN:

Que Raquel Posado Ferreras, Licenciada en Veterinaria, ha realizado bajo nuestra dirección, el trabajo que, para optar a grado de Doctor, presenta con el título:
ESTUDIO DE LA CALIDAD SEMINAL DEL TORO DE LIDIA:
FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO.

Madrid a 11 de junio de 2014

Fdo. Jose Jaime Gosálvez Berenguer

Mª del Carmen López Fernández

Fdo. Marta Hernández Pérez

Para la realización de esta tesis, la autora ha disfrutado de una beca subvencionada por el Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL), ente público de derecho privado perteneciente a la Consejería de Agricultura y Ganadería de la Junta de Castilla y León. Los diversos protocolos realizados para la materialización de esta tesis doctoral han sido financiados por los siguientes proyectos de investigación: Evaluación de la fragmentación del ADN en espermatozoides del Toro de Lidia como nuevo parametro de control de la calidad seminal. PEP: 2007/1483. Evaluación de la estructura de la cromatina del ADN espermático en la raza de Lidia de Castilla y León. PEP 2008/232120. Financiación autónoma del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL).

Agradecimientos

A Marta, mi directora de tesis por haberme orientado desde el principio, por la ilusión, el empuje y el ánimo que me has transmitido y por todo lo que me has enseñado a nivel profesional y personal.

A Carmen y Jaime, mis directores de tesis, por la confianza que habéis depositado en mí, por transmitirme vuestra experiencia y consejos a lo largo de esta larga travesía y por vuestra inmensa paciencia.

A los tres, ha sido un placer trabajar con vosotros, gracias.

A todo el equipo del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, por el apoyo y la ayuda que me habéis brindado en el procesado y análisis de las muestras.

A todos los compañeros del Departamento de Genética, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid, por hacer mi estancia muy agradable, en especial a Paqui por esas horas que compartimos en el laboratorio.

Al Instituto Español de genética y Reproducción Animal (IEGRA), muy especialmente a Antonio e Isabel, gracias por confiar en mí, por enseñarme vuestra experiencia y trabajo en el Toro de Lidia y poner a mi disposición todo lo necesario para el desarrollo de mi trabajo.

A Juan Andrés y todo su equipo del Departamento de Reproducción del CENSYRA de Badajoz y a la Asociación Nacional de Ganado Vacuno de la Raza Blanca Cacerreña, por la confianza depositada en mí y facilitarme, desde el primer momento, los animales e instalaciones necesarios para llevar a cabo este proyecto.

Sin vosotros nunca habría sido posible realizar este trabajo, gracias.

A todos mis compañeros del Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, que me animaron desde el inicio en este proyecto, especialmente a Juanjo, Rebeca, Dani, David, Luis y Sara por vuestros ánimos continuos y ayudarme en todo lo que estaba en vuestra mano. Dani, gracias por el apoyo y las horas que me has dedicado.

Y a todas las personas que de una u otra manera habéis colaborado en el desarrollo de este trabajo de investigación.

Agradecimientos

A mi hermano, Rubén, por estar ahí siempre que lo he necesitado, por apoyarme en los momentos difíciles y como no...por esos buenos ratos que siempre hemos compartido y seguiremos compartiendo. Y a mi sobrino Jorge, que a pesar de no verte todo lo que me gustaría, tus abrazos y tu sonrisa son siempre mi mejor terapia.

Y por último a mis padres, Leandro y M^a Antonia, por haberme enseñado que con sacrificio y esfuerzo todo es posible, por ser el mejor ejemplo a seguir y por apoyarme siempre con los ojos cerrados, gracias por quererme tanto, por vuestra comprensión y paciencia.

A todos, MUCHAS GRACIAS

*A Leandro y M^a Antonia,
y a mis mejores amigos, Rubén y Jorge.*

ÍNDICE

ÍNDICE.....	13
ÍNDICE DE FIGURAS.....	21
ÍNDICE DE TABLAS.....	25
ABREVIATURAS.....	27
 RESUMEN	30
 SUMMARY.....	34
 INTRODUCCIÓN.....	38
1. LA RAZA DE LIDIA	41
1.1. AGRUPACIONES ORIGINARIAS	42
1.2. CASTAS Y ENCASTES ACTUALES.....	45
1.3. SELECCIÓN.....	49
1.4. PRUEBAS DE VALORACIÓN FUNCIONAL.....	50
1.4.1. TIENTA.....	50
1.4.2. RETIENTA.....	52
1.4.3. INDULTO.....	52
1.4.4. COMPROBACIÓN DE LA DESCENDENCIA.....	52
1.5. MANEJO DE LA REPRODUCCIÓN.....	53
1.5.1. SISTEMA DE MONTA NATURAL.....	54
1.5.2. SISTEMA DE MONTA DIRIGIDA.....	54
2. LA RAZA BLANCA CACEREÑA	55
2.1. ORIGEN.....	55
2.2. CONSERVACIÓN Y FUNCIONALIDAD.....	56
2.3. SELECCIÓN.....	58
2.4. MANEJO DE LA REPRODUCCIÓN.....	59
3. EVALUACIÓN DEL SEMENTAL.....	60
3.1. SISTEMAS DE RECOLECCIÓN DE SEMEN.....	61
3.1.1. VAGINA ARTIFICIAL.....	61
3.1.2. ELECTROEYACULACIÓN	62
3.1.3. POSTMÓRTEM.....	62
3.2. INSEMINACIÓN ARTIFICIAL	64
4. DEFECTOS DE LOS ESPERMATOZOIDES.....	65
5. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS SEMINALES.....	66
5.1. ASPECTO Y VOLUMEN	66
5.2. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA.....	67

5.3. MOVILIDAD ESPERMÁTICA	68
5.4. ANOMALÍAS MORFOLÓGICAS	69
5.5. VIABILIDAD ESPERMÁTICA	71
6. ESTRUCTURA DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA.....	72
7. LESIONES DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA.....	75
7.1. ESPERMATOGÉNESIS DEFECTUOSA.....	76
7.2. APOPTOSIS	77
7.3. ESTRÉS OXIDATIVO	78
8. FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	78
8.1. EVALUACIÓN DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN	81
8.2. METODOLOGÍAS PARA LA DETECCIÓN DEL DAÑO EN EL ADN ESPERMÁTICO	83
8.2.1. TEST DE DISPERSION DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA (SCD SPERM CHROMATIN DISPERSION)	83
8.2.2. ENSAYO DE COMETAS	84
8.2.3. ENSAYO DE ESTRUCTURA DE LA CROMATINA (SCSA: SPERM CHROMATIN STRUCTURE ASSAY).....	86
8.2.4. ENSAYO DE MARCADO DEL EXTREMO LIBRE POR DUTP (TUNEL: TERMINAL DUTP NICK-END LABELING).....	87
8.2.5. PRUEBA DE ISNT (IN SITU NICK TRANSLATION)	87
8.2.6. TEST DE DETECCIÓN DE LA ROTURA DEL ADN POR HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (DBD-FISH: DNA BREAKAGE DETECTION-FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION)	88

OBJETIVOS90

MATERIAL Y MÉTODOS94

1. MATERIAL.....	96
1.1. REACTIVOS	96
1.1.1. PROCESADO DEL MATERIAL SEMINAL.....	96
1.1.2. TEST SPERM CHROMATIN DISPERSION (TEST SCD)	96
1.1.3. TEST DE VIABILIDAD.....	96
1.1.4. ENSAYO DE COMETAS	96
1.2. PLÁSTICO Y VIDRIO.....	96
1.3. APARATOS Y EQUIPAMIENTO.....	97
1.4. MATERIAL BIOLÓGICO	99
1.4.1. ANIMALES	99
2. MÉTODOS.....	100

2.1. COLECTA DE MATERIAL SEMINAL.....	100
2.1.1. ELECTROEYACULACIÓN	100
2.1.2. VAGINA ARTIFICIAL.....	102
2.1.3. RECOGIDA POSTMÓRTEM POR FLUJO RETRÓGRADO ...	103
2.2. PROCESADO Y CONGELACIÓN DE MATERIAL SEMINAL.....	104
2.3. DESCONGELACIÓN DE DOSIS SEMINALES.....	105
2.4. EVALUACIÓN DE PARÁMETROS EXPERMÁTICOS	105
2.4.1. VOLUMEN.....	106
2.4.2. CONCENTRACIÓN ESPERMÁTICA.....	106
2.4.3. MOVILIDAD ESPERMÁTICA	106
2.4.4. ANÁLISIS CON SISTEMA CASA DEL EYACULADO BOVINO	107
2.4.5. ANOMALÍAS MORFOLÓGICAS.....	108
2.4.6. ANÁLISIS DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO	108
2.4.6.1. Test de Dispersion de la Cromatina Espermática	108
2.4.6.2. Ensayo de Cometa neutro.....	110
2.4.7. TINCIÓN DE LA VIABILIDAD ESPERMÁTICA.....	111
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	112
 RESULTADOS	 114
1. CARACTERÍSTICAS DEL ADN ESPERMÁTICO BOVINO	116
1.1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA SCD EN BOVINO.....	116
1.2. ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN BASAL DEL ADN ESPERMÁTICO BOVINO.....	117
1.2.1. CORRELACIÓN ENTRE EL IF Y OTROS PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL.....	117
2. FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN LA CALIDAD SEMINAL DE LAS RAZAS DE LIDIA Y BLANCA CACEREÑA.....	120
2.1. INFLUENCIA DE LA RAZA BOVINA	120
2.2. INFLUENCIA DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN UTILIZADO...121	
2.2.1. EXTRACCIÓN SEMINAL POR VAGINA ARTIFICIAL FRENTE A ELECTROEYACULACIÓN EN LA RAZA BLANCA CACEREÑA	121
2.2.2. INFLUENCIA DE LA EXTRACCIÓN SEMINAL POSTMÓRTEM EN LA RAZA DE LIDIA	122
2.3. INFLUENCIA DE LA EDAD.....	124
2.3.1. RAZA DE LIDIA	124
2.3.2. RAZA BLANCA CACEREÑA.....	125
3. DINÁMICA DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO BOVINO	125
3.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA DINÁMICA DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO BOVINO	126

3.1.1. EFECTO DE LA EXTRACCIÓN POSTMÓRTEM SOBRE LA DINÁMICA DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN LA RAZA DE LIDIA.....	129
3.2. VARIABILIDAD INDIVIDUAL EN LA DINÁMICA DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO DE LA RAZA DE LIDIA	130
3.2.1. ESTUDIO COMPARATIVO EN DOSIS SEMINALES PROCEDENTES DEL MISMO EYACULADO.....	131
3.2.2. ESTUDIO COMPARATIVO DE DOSIS SEMINALES PROCEDENTES DE EYACULADOS DIFERENTES DEL MISMO SEMENTAL.....	135
3.3. ESTUDIO COMPARATIVO EN DOSIS SEMINALES EXTRAÍDAS POR VAGINA ARTIFICIAL Y POR ELECTROEYACULACIÓN	139
DISCUSIÓN.....	144
1. CARACTERÍSTICAS DEL ADN ESPERMÁTICO BOVINO	146
1.1. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA SCD EN BOVINO.....	146
1.2. ÍNDICE DE FRAGMENTACIÓN BASAL DEL ADN ESPERMÁTICO BOVINO.....	147
1.2.1. CORRELACIÓN ENTRE EL IF Y OTROS PARÁMETROS DE CALIDAD SEMINAL EN LAS RAZAS DE LIDIA Y BLANCA CACEREÑA.....	151
2. FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN LA CALIDAD SEMINAL DE LA RAZA DE LIDIA Y BLANCA CACEREÑA.....	154
2.1. INFLUENCIA DE LA RAZA BOVINA	154
2.2. INFLUENCIA DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN UTILIZADO..	159
2.2.1. EXTRACCIÓN SEMINAL POR VAGINA ARTIFICIAL FRENTE A ELECTROEYACULACIÓN EN LA RAZA BLANCA CACEREÑA.....	159
2.2.2. INFLUENCIA DE LA EXTRACCIÓN SEMINAL POSTMÓRTEM EN LA RAZA DE LIDIA	161
2.3. INFLUENCIA DE LA EDAD	166
3. DINÁMICA DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO BOVINO	171
3.1. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA DINÁMICA DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO BOVINO.....	171
3.1.1. EFECTO DE LA EXTRACCIÓN POSTMÓRTEM SOBRE LA DINÁMICA DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN EN LA RAZA DE LIDIA.....	174
3.2. VARIABILIDAD INDIVIDUAL EN LA DINÁMICA DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO DE LA RAZA DE LIDIA	176

Índice

3.2.1. ESTUDIO COMPARATIVO DE DOSIS SEMINALES PROCEDENTES DEL MISMO EYACULADO	177
3.2.2. ESTUDIO COMPARATIVO DE DOSIS SEMINALES PROCEDENTES DE EYACULADOS DIFERENTES DEL MISMO SEMENTAL.....	178
3.3. ESTUDIO COMPARATIVO EN DOSIS SEMINALES EXTRAÍDAS POR VAGINA ARTIFICIAL Y POR ELECTROEYACULACIÓN	179

CONCLUSIONES.....	182
--------------------------	------------

BIBLIOGRAFIA.....	186
--------------------------	------------

FIGURAS

Figura 1. Toros de Lidia en la dehesa de la provincia de Salamanca	42
Figura 2. Mapa de la Península Ibérica con la localización de los troncos originarios de la raza de Lidia.....	42
Figura 3. Ganadería actual de origen navarro. Imagen cedida por el propietario D. Miguel Reta.....	43
Figura 4. Esquema general del origen de la Casta Cabrera	45
Figura 5. Esquema general del origen de la Casta Gallardo.....	46
Figura 6. Derivaciones actuales de la Casta Vazqueña	46
Figura 7. Esquema general de los encastes actuales derivados de la Casta Vistahermosa: Conde de Santa Coloma	47
Figura 8. Esquema del origen de los encastes Villamarta, Vega-Villar y Torrestrella.....	48
Figura 9. Esquema general de los encastes actuales de la Casta Vistahermosa: Derivados de Parladé.....	48
Figura 10. Esquema del proceso de selección de reproductores en la raza de Lidia	50
Figura 11. Tienta en corral de machos de la raza de Lidia. Imagen cedida por D. Pedro Luis Martín	51
Figura 12. Acoso y derribo de un novillo durante una tienta a campo abierto. Imagen cedida por D. Pedro Luis Martín	51
Figura 13. Diagrama del periodo reproductivo de la raza de Lidia dependiendo de su localización en la Península Ibérica.....	53
Figura 14. Evolución del número de reproductoras de la raza Blanca Cacereña (Romero, 2009).	57
Figura 15. Semental de la raza Blanca Cacereña del CENSYRA de Badajoz.....	58

Figura 16. Cruzamientos dirigidos en las instalaciones del CENSYRA de Badajoz.....	60
Figura 17. Proceso de colecta de semen por electroeyaculación a un toro de Lidia en el muevo de contención.....	62
Figura 18. Extracción postmórtem de semen de toro por flujo retrógrado. Testículo (a). Epidídimo (b). Extracción por flujo retrógrado(c)	63
Figura 19. Eyaculado de un toro de Lidia en el tubo colector.....	67
Figura 20. Análisis de parámetros seminales clásicos de toro bravo en condiciones de campo. Espectrofotómetro.....	68
Figura 21. Espermatozoides observados al microscopio óptico de contraste de fases (×20).....	69
Figura 22. Estructura del ADN de una célula somática y una célula espermática	73
Figura 23. Espermatozoides de la raza de Lidia sometidos al test SCD observados por microscopía de fluorescencia. La flecha indica un espermatozoide con el ADN del núcleo fragmentado	84
Figura 24. Espermatozoides fragmentados y sin fragmentar de toro de Lidia analizados por la técnica SCD (a) y por ensayo Cometa neutro (b)....	117
Figura 25. Grupos de fragmentación del ADN espermático bovino en función de la raza.....	118
Figura 26. Velocidad de degradación del ADN espermático en función de la temperatura de incubación: $V = (IF \text{ a } T2 - IF \text{ a } T1) / \text{Tiempo de incubación}$	127
Figura 27. Número de dosis que alcanzan un $IF \geq 20\%$ en función del tiempo de incubación y la temperatura de incubación	128
Figura 28. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático de la raza de Lidia hasta las 96h de incubación a 22 °C y 38,6 °C.....	129

Figura 29. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático de la raza de Lidia por extracción postmórtem en función de la temperatura de incubación a 22 °C y 38,6 °C.....	130
Figura 30. Dinámica de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas del mismo eyaculado del toro nº 1..	132
Figura 31. Dinámica de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas del mismo eyaculado del toro nº 2..	132
Figura 32. Dinámica de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas del mismo eyaculado del toro nº 3..	133
Figura 33. Dinámica de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas del mismo eyaculado del toro nº 4..	133
Figura 34. Dinámica de fragmentación del ADN espermático a 22 °C de 2 dosis seminales criopreservadas del mismo eyaculado del toro nº 4..	134
Figura 35. Dinámica de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas del mismo eyaculado del toro nº 5..	134
Figura 36. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 10 dosis seminales criopreservadas de eyaculados diferentes del Toro A ..	135
Figura 37. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 8 dosis seminales criopreservadas de eyaculados diferentes del Toro B..	136
Figura 38. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 5 dosis seminales criopreservadas de eyaculados diferentes del Toro C..	136
Figura 39. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas de eyaculados diferentes del Toro D..	137
Figura 40. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas de eyaculados diferentes del Toro E ..	137
Figura 41. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 5 dosis seminales criopreservadas de eyaculados diferentes del Toro F...	138

- Figura 42.** Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 3 dosis seminales criopreservadas de eyaculados diferentes del Toro G.138
- Figura 43.** Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas de los eyaculados extraídos por electroeyaculación (N=1) y vagina artificial (N=1) del toro BC nº 1 ... 140
- Figura 44.** Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas de los eyaculados extraídos por electroeyaculación (N=1) y vagina artificial (N=1) del toro BC nº 2 ... 140
- Figura 45.** Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas de los eyaculados extraídos por electroeyaculación (N=1) y vagina artificial (N=1) del toro BC nº 3 141
- Figura 46.** Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas de los eyaculados extraídos por electroeyaculación (N=1) y vagina artificial (N=1) del toro BC nº 4 141
- Figura 47.** Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas de los eyaculados extraídos por electroeyaculación (N=1) y vagina artificial (N=1) del toro BC nº 5142
- Figura 48.** Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas de los eyaculados extraídos por electroeyaculación (N=1) y vagina artificial (N=1) del toro BC nº 1 142

TABLAS.

Tabla 1. Estudio genealógico de la raza Blanca Cacerña (Parejo y col., 2008) ..	60
Tabla 2. Esquema de anomalías morfológicas de los espermatozoides adaptado y actualizado de “XX Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Barth A.L., Oko R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press, Iowa. 1989.....	71
Tabla 3. Fragmentación del ADN espermático de una dosis seminal de toro de Lidia con dos técnicas de análisis: SCD y ensayo Cometa neutro...	116
Tabla 4. Grupos de fragmentación del ADN espermático bovino.....	117
Tabla 5. Correlaciones de los parámetros espermáticos analizados en fresco y tras la descongelación	119
Tabla 6. Parámetros espermáticos de eyaculados en fresco y postdescongelación de toros de la raza de Lidia, Blanca Cacerña y razas especializadas	121
Tabla 7. Comparativa de los parámetros espermáticos de eyaculados en fresco y postdescongelación analizados tras la extracción con vagina artificial y por electroeyaculación	122
Tabla 8. Comparativa de los parámetros espermáticos de eyaculados en fresco y postdescongelación obtenidos por extracción postmórtem (N=10 en IF y en MI; N=9 en VOL, MM, MP, AM, MID, AMD; N=8 en CC; N=7 en MPD y V) y por electroeyaculación (N=74 en IF; N=58 en MP; N=35 en V; N=73 en VOL, CC, MM, MI, MID MPD AM, AMD).....	123
Tabla 9. Comparativa de los parámetros espermáticos en función de los grupos de edad en la raza de Lidia.....	124
Tabla 10. Comparativa de los parámetros espermáticos en función de los grupos de edad en la raza Blanca Cacerña.....	125
Tabla 11. Dinámica de fragmentación del ADN espermático de la raza de Lidia a 38,6 °C y 22 °C durante 240h de incubación.....	126

Índice

Tabla 12. Dinámica de fragmentación postmórtem a 38,6 °C y 22 °C hasta 96h de incubación.....	129
Tabla 13. Dinámica de fragmentación del ADN espermático de dosis pertenecientes a 6 toros de la raza Blanca Cacecreña por vagina artificial (N=6) y por electroeyaculación (N=6) a 38,6 °C	139

Abreviaturas

AM: Anomalías morfológicas.

AMD: Anomalías morfológicas postdescongelación.

AO: Naranja de Acridina.

ASMA: Computer Assisted Sperm head Morphometry Analysis.

AT: Azul de Toluidina.

BC: Raza Blanca Cacereña.

BrEt: Bromuro de etidio.

CASA: Computer Assisted Sperm Motility Analysis.

CC: Concentración espermática.

CIA: Centro de Inseminación Artificial.

CLM: Calidad del movimiento espermático.

CMA: Cromomicina A3.

DAPI: 4,6 diamidino-2-fenilindol.

DBD-FISH: DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization.

DTT: ditioneitol.

dUTP: Ddeoxiuridina trifosfato.

E: Espermatozoides estáticos.

EE: Electroeyaculación

EP: Espermatozoides epididimarios.

EY: Espermatozoides eyaculados.

FIV: Fecundación In Vitro.

HDS: High DNA Stainability.

IA: Inseminación artificial.

ICSI: Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides.

IF: Índice de fragmentación del ADN espermático.

IP: Yoduro de propidio.

ISNT: In Situ Nick Translation.

L: Espermatozoides lentos

M: Espermatozoides medios.

MI: Movilidad individual.

MID: Movilidad individual postdescongelación.

Abreviaturas

MM: Movilidad masal.
MP: Movilidad progresiva.
MPD: Movilidad progresiva postdescongelación.
RL: Raza de Lidia
RP: Espermatozoides rápidos progresivos.
ROS: Radicales libres de oxígeno.
SCD: Sperm Chromatin Dispersion.
SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay.
TUNEL: Terminal dUTP Nick-End Labeling.
UCTL: Unión de Criadores de Toros de Lidia.
V: Viabilidad postdescongelación.
VA: Vagina artificial.
VOL: Volumen

RESUMEN

Resumen

La raza bovina de Lidia es una raza autóctona española explotada bajo un sistema tradicional extensivo puro, donde, con cada vez más frecuencia, se están implementando nuevas tecnologías de reproducción asistida, aunque con escaso éxito reproductivo. Esto podría deberse al propio comportamiento de estos animales y por el desconocimiento en la fisiología reproductiva de este ganado, entre otros factores.

Esta tesis pretende profundizar en el estudio del seminograma clásico de los sementales de la raza de Lidia incluyendo, un nuevo parámetro indicativo de la capacidad fertilizante de los espermatozoides denominado el índice de fragmentación del ADN espermático. Para determinar este valor se ha empleado el Test de Dispersión de la Cromatina Espermática, una técnica de fácil implementación en el análisis laboratorial de calidad seminal.

El análisis de la integridad del ADN en muestras de semen fresco y criopreservadas de ganado bovino, se relacionó con los parámetros clásicos de calidad seminal (volumen, concentración, parámetros de movilidad, anomalías morfológicas y viabilidad) observándose poca relación, lo que sugiere que, en principio, se tratarían de parámetros independientes pero complementarios.

Además, se estudió la posible influencia de las características inherentes al semental, tales como la raza, la edad y el método de extracción seminal, utilizando en algunos casos, la raza Blanca Cacerña y un grupo de razas especializadas. Se observaron diferencias interraciales, con el envejecimiento y entre los métodos de extracción seminal, en la fragmentación y otros parámetros de calidad seminal.

Tras lo descrito, se investigó la fragmentación del ADN espermático desde un punto de vista dinámico. Se estudió la dinámica de fragmentación *in vitro* del ADN espermático en dosis seminales criopreservadas, su relación con la temperatura de incubación, la variabilidad inter-individual e intra-individual en el mismo y diferentes eyaculados y se realizaron comparaciones entre eyaculados obtenidos por diferentes métodos de extracción.

Con los datos obtenidos, se concluye que dada la repetibilidad en las medidas del índice de fragmentación del ADN espermático, hacen de este parámetro un valioso marcador de la fertilidad del toro. Por tanto, su análisis junto con el resto de

Resumen

pruebas tradicionales de calidad seminal, concederían mayor fiabilidad en la decisión final sobre la utilidad o no de los eyaculados con vistas a ejecutar con éxito las técnicas de reproducción asistida y contribuiría a perfeccionar la selección de los reproductores.

SUMMARY

Summary

Lidia bovine breed is Spanish native cattle which are reared under traditional extensive production systems. Nevertheless, new different types of assisted reproductive treatments are being used without success due to the inherent animal behaviour. Moreover, data on reproduction performance of cattle are still largely unknown in this breed, among other factors.

In this thesis we studied the classical semen parameters of Lidia breed, through a new sperm parameter which show the fertilization capacity of the spermatozoa called sperm DNA fragmentation index value. In order to assess this parameter we used Sperm Chromatin Dispersion Test. This simple technique can be used as an additional tool in the laboratory assessment of sperm quality.

The results of DNA integrity of both fresh ejaculates and cryopreserved sperm samples were compared with the classical seminal parameters (volumen, concentration, sperm motility parameters, morphology and viability). We reported only a weak or no correlation between conventional semen parameters and sperm DNA fragmentation. Therefore, they would be independent but complementary parameters.

We also studied the influence of the characteristic inherent to the bulls, such as breed, age and the effect of semen collection method. Lidia and several selected breeds of bulls were analysed. We observed some interracial differences with the aging and the semen collection methods.

After that, we investigated sperm DNA fragmentation through a temporal process. We also studied the dynamic of sperm DNA fragmentation in cryopreserved sperm samples in vitro, relationships between dynamics of sperm DNA fragmentation and incubation temperatures in vitro, and analysis of the inter-individual and intra-individual variation in the same and different ejaculates. In addition, comparisons between ejaculates obtained by different semen collection methods were done.

This leads us to conclude that the fact that measures of the sperm DNA fragmentation index are highly repeatable. This result implies that this parameter is a valuable marker of bull fertility. Therefore, including the evaluation of sperm DNA

Summary

integrity within routine sperm parameters would add further information about the quality of ejaculates to succeed in assisted reproductive treatments and it would contribute to improve Lidia bulls selection.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, se está fomentando la producción de ganado vacuno en régimen extensivo para recuperar los sistemas tradicionales utilizados años atrás en nuestro país. Las razas bovinas autóctonas necesitan de una tecnificación de la producción en extensivo para que la ganadería resulte competitiva frente a otros sistemas de producción más rentables. En este contexto, resulta necesario incrementar la productividad del ganado rústico con la introducción de nuevas tecnologías en todos los aspectos productivos (alimentación, manejo, sanidad, genética, reproducción, etc.).

La crianza de la raza de Lidia por su comportamiento, características maternas y rusticidad es una actividad pecuaria muy diferente de las actividades ganaderas tradicionales con un objetivo principal, la producción de comportamiento, manifestado en la aptitud para la lidia. El mérito genético buscado con la selección de los reproductores está basado en parámetros etológicos difíciles de cuantificar como la rectitud y prontitud de la embestida, y morfológicos como las hechuras, el trapío o la cornamenta.

Otra raza autóctona es la raza Blanca Cacerña, de aptitud cárnica considerada en peligro de extinción (MAGRAMA, ARCA 2014). Las nuevas políticas europeas que favorecen la protección de los espacios naturales y el fomento de una agricultura sostenible, ha supuesto un punto de inflexión favorable para su recuperación. Desde 1970, se han realizado importantes esfuerzos por incrementar los efectivos de esta raza, pero su procedencia a partir de 51 individuos ha generado una alta consanguinidad y problemas de introgresión genética que han provocado severos problemas a nivel reproductivo.

De poco sirve la selección realizada en la raza de Lidia, y los esfuerzos por mejorar los censos de la raza Blanca Cacerña, si los animales presentan bajas tasas de concepción, resultando necesario implantar en las ganaderías las actuales técnicas reproductivas existentes en el mercado, como por ejemplo, el examen de fertilidad a futuros sementales.

El examen andrológico incluye un reconocimiento físico previo y un estudio de la integridad, normalidad anatómica y funcional de las gónadas y sus envolturas, y un

buen funcionamiento del aparato reproductor del semental. Si dicho examen resulta normal, se realiza la recogida y posterior evaluación del eyaculado. Los análisis rutinarios incluyen el estudio de características seminales clásicas como el volumen seminal, la concentración, movilidad, viabilidad, morfología. Sin embargo, en la práctica se ha comprobado que eyaculados con valores semejantes en los parámetros citados presentan importantes variaciones en los resultados de fertilidad individual. Entre las posibilidades que otorgan las nuevas tecnologías se incluye una mejora de la valoración seminal tradicional, siendo posible conocer y analizar complejas funciones del espermatozoide lo que ha incrementado el listado de defectos espermáticos diagnosticables, cuya evaluación no era factible con la tecnología disponible en el pasado más reciente.

El presente trabajo tiene como finalidad estudiar nuevos parámetros seminales con innovadoras herramientas de análisis reproductivo, como el análisis de la fragmentación del ADN espermático, que permitan poner de relieve la importancia de la valoración de la calidad de los espermatozoides en el eyaculado del semental para asegurar una buena fertilidad en la explotación ganadera.

1.- LA RAZA DE LIDIA.

La raza de Lidia es una raza autóctona española caracterizada por su rusticidad y crianza en un sistema extensivo (Figura 1). Posee las peculiaridades de ser seleccionada en base a parámetros etológicos y zootécnicos que ha generado un importante aislamiento reproductivo, del resto de las razas bovinas domésticas (UCTL, 2005; Silva y col., 2006). El aislamiento de las poblaciones ha generado que, la diversidad genética de la raza de Lidia sea superior a la observada en la mayoría de las razas bovinas europeas (Cañón y col., 2008). La raza de Lidia es también, una de las razas bovinas más antiguas del mundo, pionera en la implantación de un programa de selección relativamente complejo basado en caracteres propios de sus específicos objetivos productivos y en el que ya existían registros genealógicos desde el año 1836 (Montes, 1836).

En cuanto a su conformación presentan alto grado de variación cromática del pelaje, oscilaciones extremas del perfil frontonasal, variedad de encornaduras, proporciones, tamaños y pesos. (MAGRAMA, ARCA, 2014).



Figura 1. Toros de lidia en la dehesa de la provincia de Salamanca.

1.1.- Agrupaciones originarias.

La ganadería de reses bravas entendida como industria pecuaria dedicada a la cría y selección del toro para la lidia, tuvo sus comienzos entre los siglos XVI al XVIII. En esta época surgen terratenientes navarros, castellanos y andaluces, que forman vacadas con bovinos semisalvajes de sus correspondientes regiones entre las que comienzan a seleccionar aquellas reses más adecuadas para los espectáculos taurinos de la época (Bello, 2006). De la selección realizada por estos ganaderos, surgen las Castas Fundacionales de la raza de Lidia (Figura 2).



Figura 2. Mapa de la Península Ibérica, con la localización de los troncos originarios de la raza de Lidia.

El tronco Navarro parece tener un origen celta y su procedencia deriva de las reses que se criaban desde la antigüedad en las Bardenas Reales, en la provincia de Aragón, La Rioja y Navarra del siglo XIV (Rodríguez, 2002; Bello, 2006). Dando lugar a la casta más antigua de España, la Casta Navarra (Figura 3).



Figura 3. Ganadería actual de origen navarro. Foto cedida por el propietario, D. Miguel Reta.

El tronco castellano tiene su origen en Castilla la Vieja del siglo XV (Bello, 2006). Se asentó en las dos mesetas y Extremadura, y de él derivaron tres castas muy importantes a principios del siglo XVIII, la casta Jijona, la casta Colmenareña o de la Tierra y la casta Castellana o Morucha-Castellana (Bello, 2006) extinguidas en la actualidad.

El tronco Andalúz tiene su origen en el valle del Guadalquivir a comienzos del siglo XVII (Rodríguez, 2002) y de ella derivaron tres castas que con el paso del tiempo, han dado lugar al prototipo del toro bravo actual:

- Casta Vistahermosa: fundada en 1733 por D. Pedro Luis de Ulloa y Calis, Conde de Vistahermosa, nacido en Utrera (Sevilla) tras adquirir parte de la ganadería a los hermanos Rivas (Sevilla). Es en 1821 cuando parte de las reses las adquiere D. Juan Domínguez Ortiz, más conocido como el “Barbero de Utrera”. De la ganadería originaria de Vistahermosa descienden líneas directamente entroncadas con la mayor parte de las ganaderías actuales y estas líneas a su vez fueron la raíz de distintas estirpes y encastes (MIRA, 1981) tales como, el encaste

Murube, Saltillo, Ibarra y Parladé (Marquesa Tamarón) y actualmente constituye la base fundamental de la raza bovina de Lidia. (Figuras 7 y 9)

- Casta Cabrera: surge por la recaudación de los diezmos de ciertos conventos de Jerez de la Frontera y Sevilla. En el siglo XVII ya disponen de vacadas organizadas para la lidia, entre las que destacaba la de la Cartuja de Jerez. Actualmente, sólo la ganadería de Miura, conserva esta genética, con reminiscencias de otros orígenes (Figura 4).
- Casta Vazqueña: formada a partir del cruce de animales de distintas ganaderías de origen casta Cabrera con animales de casta Vistahermosa, realizado por D. Vicente José Vázquez a partir de 1790.

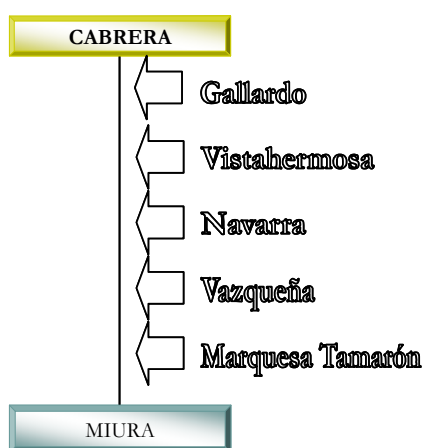


Figura 4. Esquema general del origen de la casta Cabrera.

Por cruces entre ejemplares de la casta Navarra y Cabrera surge otra casta fundacional:

- Casta Gallardo: deriva de la ganadería formada en 1758 por, D. Marcelino Bernaldo de Quirós Gallé, sacerdote de Rota (Cádiz), con vacas y sementales de casta Navarra a las que sumó ganado adquirido en 1762 a los padres dominicos del Convento de San Jacinto de Sevilla de origen común a la casta Cabrera. En la actualidad únicamente la ganadería de Partido de Resina, posee la genética original de la casta Gallardo, con reminiscencias genéticas de la casta Vazqueña (Figura 5).

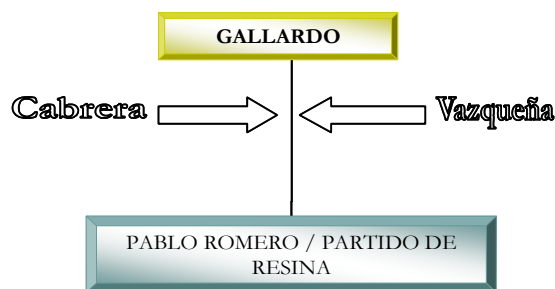


Figura 5. Esquema general del origen de la casta Gallardo.

1.2.- Castas y encastes actuales.

Las distintas variedades de la raza, se crean por el origen fundacional múltiple de la raza, la fidelidad de los ganaderos a mantenerse dentro de un determinado origen, los criterios personales de selección de los criadores y el importante aislamiento reproductivo.

La selección y cruzamientos realizados entre las castas fundacionales de procedencia o entre castas y encastes del mismo tronco han dado lugar a la enorme diversidad genética y morfológica distribuida entre las ganaderías y encastes. Estudios filogenéticos, han demostrado que la distancia genética entre los encastes es superior relativamente a la observada entre razas bovinas europeas, lo que demuestra que la raza de Lidia debería ser considerada como una “metaraza” o raza de razas (Cañón y col., 2008; Cortés y col., 2011).

En la actualidad, el prototipo racial de la raza bovina de Lidia, está publicado en el Real Decreto 60/2001 de 26 de enero, B.O.E. núm. 38 de 13 de febrero de 2001, según el cual existen en la cabaña brava los siguientes prototipos raciales.

- Casta Navarra (Figura 3).
- Casta Cabrera. En la actualidad se conserva únicamente la ganadería de Miura (Figura 4).
- Casta Gallardo. El único representante de esta casta, aunque no en pureza, es la ganadería de Partido de Resina (Figura 5).

- Casta Vazqueña. En la actualidad se conserva una pequeña representación de sus dos líneas principales (Figura 6).

- Línea Concha y Sierra.
- Línea Veragua. (Ganadería Prieto de la Cal).

Así como la aportación realizada para la creación de los encastes de Vega-Villar e Hidalgo Barquero por cruces con la Casta Vistahermosa.

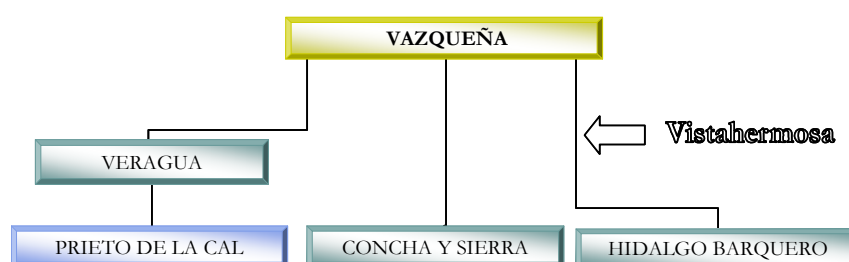


Figura 6. Derivaciones actuales de la casta Vazqueña.

- Casta Vistahermosa. De ella derivan 13 encastes de una forma pura y directa y otros tres por realización de cruces en los que esta casta ha tenido una importante aportación (Figura 7 y 8).

- Encaste Albaserrada.
- Encaste Contreras.
- Encaste Murube - Urquijo.
- Encaste Saltillo.
- Encaste Santa Coloma:
 - Línea Buendía.
 - Línea Coquilla.
 - Línea Graciliano Pérez -Tabernero.
- Encaste Urcola.

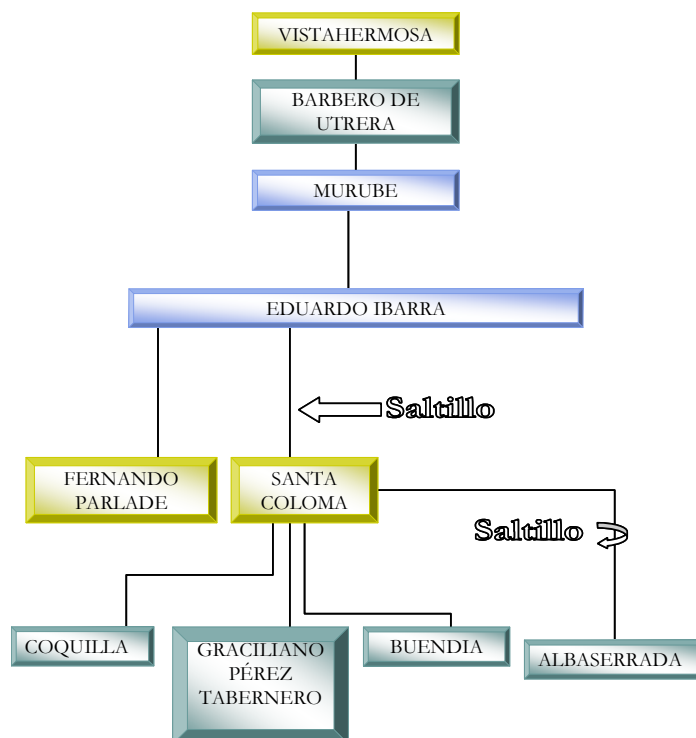


Figura 7. Esquema general de los encastes actuales derivados de la casta Vistahermosa: Conde de Santa Coloma.

Derivados de Parladé (Figura 9):

- Encaste Atanasio Fernández.
- Encaste Conde de la Corte.
- Encaste Gamero Cívico.
- Encaste Juan Pedro Domecq.
- Encaste Núñez.
- Encaste Pedrajas.
- Encaste Torrestrella (Figura 8).

Cruces con Vistahermosa:

- Encaste Hidalgo- Barquero (Figura 6).
- Encaste Villamarta (Figura 8).

- Encaste Vega-Villar. (Figura 8).

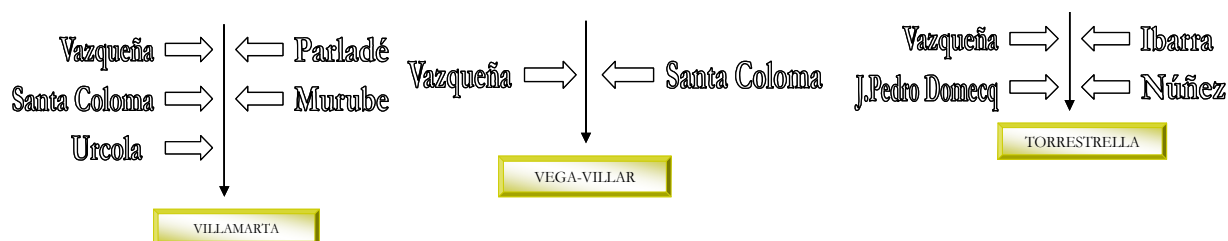


Figura 8. Esquema del origen de los encastes Villamarta, Vega-Villar y Torrestrella.

De estos encastes y de sus cruzamientos proceden la mayoría de las ganaderías que han llegado hasta nuestros días, si bien están en continua evolución, y por tanto sujetos a cambios en su morfología. En el Programa de mejora genética de la raza de Lidia aprobado por Resolución de 17 de mayo de 2011, de la Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos, prevé cambios en la clasificación de los encastes que aparecen en el prototipo racial de la raza de Lidia.

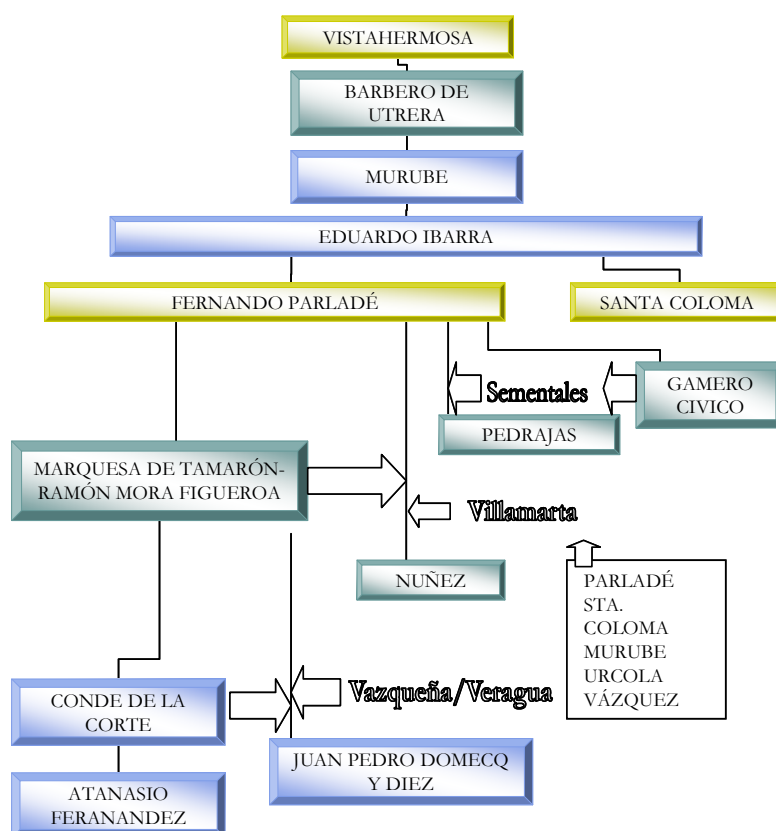


Figura 9. Esquema general de los encastes actuales de la Casta Vistahermosa: Derivados de Parladé.

1.3.- Selección.

A finales del siglo XVIII los ganaderos de bravo españoles comenzaron a aplicar un sistema de selección que en aquella época no se hacía en ninguna especie ganadera, siendo pioneros en mejora genética. A principios del siglo XX se introdujo poco a poco el cruzamiento con sementales del mismo o diferente encaste, en busca de algún carácter particular y complementario (Purroy, 2003).

Se han realizado principalmente cruzamientos dentro de líneas puras para fijar los caracteres de selección, lo que, en algunos casos, ha supuesto un aumento de los niveles de consanguinidad que han podido ocasionar la aparición de efectos favorables y desfavorables, como patrones de comportamiento indeseables durante la tiente y la lidia (Rodríguez, 1995).

Actualmente en la selección de reproductores, todavía se siguen una serie de pautas tradicionales tanto para las hembras como los machos, ejerciéndose una mayor presión de selección sobre éstos, ya que su incidencia en la procreación de la manada es mucho mayor que la de las hembras. El proceso de selección se inicia con una valoración genética de los potenciales reproductores (Figura 10). Consiste en identificar a los animales portadores de los genes más beneficiosos para los caracteres de interés deseables en la descendencia (Cañón, 2008). Para ello el ganadero realiza un filtro genealógico excluyente en base al registro histórico de puntuaciones que para determinados patrones etológicos positivos presentan las diferentes familias o reatas de su ganadería, buscando aquellos animales que a lo largo de su historia han producido las reses más destacadas. A continuación, se realiza una selección morfológica, en base a los patrones zootécnicos que definen el encaste de cada ganadería, desechando aquellas reses que se alejen del prototipo de la vacada (Rodríguez, 1997). Y por último, el ganadero realiza una valoración funcional del animal basada en la respuesta de comportamiento mostrada en las diferentes pruebas de selección (Apartado 1.4).

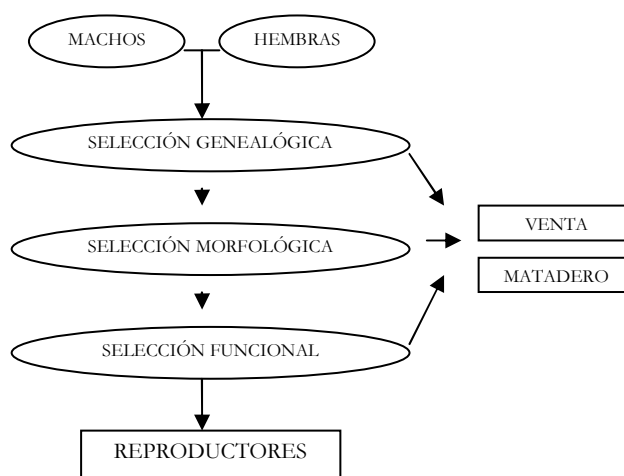


Figura 10. Esquema general del proceso de selección de reproductores en la raza de Lidia.

1.4.- Pruebas de valoración funcional.

1.4.1.- La tienta.

La tienta es una prueba de valoración de la aptitud funcional que se ha utilizado en las ganaderías de lidia desde el siglo XVIII para la selección y mejora de la raza (Guerrita, 1836; Montes, 1836). Básicamente consiste en reproducir los estímulos a los que el toro se enfrentará en la plaza de toros pero con algunas modificaciones (Rodríguez, 1997). Es una prueba de resistencia cuyo fin último es la selección de reproductores en prueba, que pasarán a ser definitivos y permanecer toda su vida en la explotación cuando se compruebe su descendencia (UCTL, 2005). Se buscan una serie de parámetros etológicos (prontitud de respuesta, embestida, fijeza, movilidad, nobleza, fiereza, agresividad, repetición etc.) en los animales, evaluados por el ganadero, para seleccionar los mejores futuros reproductores.

Existen dos procedimientos para realizar la tienta: en corral o en campo abierto.

La tienta en corral (Figura 11) se verifica en las plazas de tientas ubicadas en las propias ganaderías, evaluándose el rendimiento etológico de los animales ante el caballo y si el resultado es satisfactorio ante éste, será toreado con la muleta para valorar en conjunto todos los aspectos positivos y negativos del animal (UCTL, 2005).



Figura 11. Tienta en corral de machos de la raza de Lidia. Fotografía cedida por D. Pedro Luis Martín.

La tienta a campo abierto (Figura 12) es una faena campera tradicional, también considerada como un deporte de competición equina denominado acoso y derribo. Consiste en que dos jinetes a caballo derriban a la res en el campo, tratando de provocar su embestida al caballo del picador. Si el animal supera la prueba, en unas ocasiones es toreado a campo abierto con la muleta y en otras es retentado en la plaza de tientas (UCTL, 2005).



Figura 12. Acoso y derribo de un novillo durante la tienta a campo abierto. Fotografía cedida por D. Pedro Luis Martín.

1.4.2.- La retienta.

La retienta es una repetición de la tienta que se realiza a los animales adultos. La retienta de los machos se practica una vez constatado que su descendencia presenta las características comportamentales buscadas por el ganadero. El animal será tentado de nuevo y si el rendimiento etológico es óptimo será aprobado como semental. En el caso de las hembras, esta práctica suele realizarse cuando una ganadería adquiere un lote de hembras a otra explotación y no tiene información sobre los patrones etológicos de las reproductoras (Purroy, 2003).

1.4.3.- Indulto.

Es la prueba funcional por excelencia, ya que la selección del semental se realiza en la misma plaza de toros tras perdonarle la vida por haber mostrado unas condiciones excepcionales durante la lidia. Está definido en el artículo 83 del Real Decreto 145/1996 de 2 de febrero, actual Reglamento de Espectáculos Taurinos, como el perdón de la vida a aquellos animales de excelente comportamiento y trapío que bajo diferentes garantías reglamentarias resulten sobresalientes para la afición, el torero, el ganadero o mayoral y la Presidencia.

1.4.4.- Comprobación de la descendencia.

La selección ejercida sobre los reproductores, no se considera definitiva hasta que se realiza la comprobación de su descendencia o su capacidad de transmitir buenas cualidades a la generación siguiente (Gaudioso y Riol, 1996). Los sementales y hembras en prueba, son valorados en función de su fertilidad, aptitud para la monta, y el mérito genético o funcionalidad para la lidia, evaluado tras someter a sus descendientes a la prueba de la tienta a los 2 o 3 años de edad. Si la descendencia presenta las características etológicas seleccionadas por el criador, los reproductores serán aprobados definitivamente. El proceso de selección de reproductores, es complejo y largo en el tiempo, de forma que no comienzan a ejercer como tal, hasta los 7 u 8 años de edad, restándole únicamente 5 ó 6 años de vida útil, con la consiguiente pérdida de su potencial genético.

1.5.- Manejo de la reproducción.

El ciclo reproductivo de la raza de Lidia (Figura 13) se encuentra perfectamente adaptado a las condiciones del sistema extensivo. Las hembras presentan buena aptitud maternal, capacidad de movilización de sus reservas corporales para producir leche, reconstituir sus reservas e ingerir forrajes groseros (Compan, 2008). El periodo de cubrición varía en función de la región en la que nos encontremos, así en las zonas de clima suave (tierras bajas de Andalucía) el semental se introduce en el lote de hembras al final del invierno (febrero-marzo) mientras que en áreas de climatología más rigurosa (Salamanca, zona centro, y tierras altas de Andalucía) suele hacerse en primavera (abril - mayo). Asimismo, el periodo de partos, es más precoz en zonas de clima benigno (diciembre-abril) que en áreas de climatología adversa (febrero-junio) para no comprometer en exceso la supervivencia de los neonatos (Gaudioso y Riol, 1996; Compan, 2008).



Figura 13. Diagrama del periodo reproductivo de la raza de Lidia dependiendo de su localización en la Península Ibérica.

Todos los aspectos relativos a la reproducción de la raza de Lidia tanto en lo referente a la declaración de lotes de cubrición por el sistema de monta natural o monta dirigida, como el uso de técnicas de reproducción asistida están controlados por el MAGRAMA, a través del Libro Genealógico de la raza bovina de Lidia, cuya finalidad es mantener registradas las reses de lidia en pureza. El libro está regulado por Real Decreto 2129/2008 de 26 de diciembre por el que se establece el Programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas, y la gestión del control del Libro Genealógico lo ejercen las Organizaciones y Asociaciones

ganaderas, que tienen concedido el título de Entidades Colaboradoras, y se encargan de enviar la información correspondiente al Ministerio.

1.5.1.- Sistema de monta natural.

En el siglo XIX, los ganaderos solían disponer en un mismo cercado, de un amplio número de hembras con varios toros a la vez; esta organización de cubriciones tenía la ventaja de lograr mayores índices de fertilidad, pero imposibilitaba el control real de las paternidades.

En la actualidad, el sistema de cubrición por monta natural es el más habitual en la raza de Lidia. El ganadero establece lotes de reproductoras de número variable para toros en fase de prueba, o para un semental contrastado. La duración del periodo de cubrición oscila entre los 3 y 8 meses que permite conseguir una relativa concentración de partos y simplificar el manejo de la ganadería (Gaudioso y Riol, 1996). En ocasiones, cuando las fincas no disponen de las instalaciones necesarias y las vacas no pueden distribuirse en lotes, se introducen a los sementales por turnos para garantizar la paternidad de las crías, pero este sistema no permite elegir los cruzamientos más adecuados (Rodríguez, 2002). Entre las ventajas de la monta natural, destaca su simplicidad en el manejo y entre los inconvenientes, la diseminación de enfermedades, el incremento de las necesidades energéticas del semental y/o la infrautilización del material genético en el caso reproductores envejecidos (Sanz, 1997).

1.5.2.- Sistema de monta dirigida.

La monta dirigida es una modificación del esquema tradicional de cubrición de escasa incidencia en España en el que los sementales pueden duplicar el número de hembras atendidas. Para mejorar la rapidez y fiabilidad de la detección de celos se suele usar un animal recela que puede ser un macho entero, vasectomizado o incluso castrado, marcado con colorantes artificiales en el pecho, que impregnan la grupa de las hembras que toleran su monta, pero al que se le tapa el área prepucial para impedir la cubrición. Las vacas identificadas en celo, son transportadas y encerradas individualmente en corrales donde se conduce al semental elegido, permitiéndole realizar 1-2 saltos por monta (Gaudioso y Riol, 1996).

Entre las ventajas destaca que, un semental puede cubrir un número elevado de vacas, elegir los cruzamientos, concentrar las cubriciones y los partos, utilizar tratamientos de sincronización de celo en las hembras y mejorar el manejo reproductivo en los sementales viejos (Sanz, 1997) y entre los inconvenientes, el elevado coste de la mano de obra, la complejidad para detectar hembras en el campo y la posible inhibición sexual del macho por realizarse en condiciones no habituales.

2.- LA RAZA BLANCA CACEREÑA.

La raza Blanca Cacerña es una de las razas bovinas más antiguas de España y es el único bovino autóctono español de capa blanca. Posee un perfil eumétrico, estirado y esbelto, de tendencia ortoide con capa blanca, amarillenta o albahía, con las mucosas rosadas y ocasionalmente de tonalidad pizarrosa (Sotillo y Serrano, 1985). Se explota en condiciones extensivas y está perfectamente adaptada al ecosistema adehesado extremeño. Tiene una acusada rusticidad, son animales con un fisiologismo perfectamente adaptado a condiciones ambientales extremas y una manifiesta capacidad digestiva para aprovechar alimentos groseros (MAGRAMA, ARCA, 2014).

Su aprovechamiento actual es cárnico, carne de excelente calidad, pero con un rendimiento bajo a la canal, del orden de 50-53%, inferior a otras razas autóctonas como la Retinta o la Avileña resultando de especial interés, los cruzamientos industriales. Antiguamente, su aprovechamiento principal era triple, cárnico, animal de tiro y/o cabestro para el manejo del ganado bravo (Bartolomé y García, 1998).

2.1.- Origen.

Hay varias teorías sobre su origen, algunas apuntan a una procedencia del norte de África (Sánchez Belda, 1984, 1986) basándose en testimonios murales de cuevas prehistóricas como las de Tassili y Hermon, mientras que otras defienden su procedencia italiana (Bartolomé y García, 1998). Aunque los estudios genéticos realizados por Ambrona (1985), revelan que tiene un origen asiático por influencia del *Bos indicus*. Castelló y Díaz (2001, 2002), describen la existencia de marcadores genéticos y polimorfismos en la Blanca Cacerña que se muestran en otras razas bovinas, tanto de la península como del resto de Europa. También se ha observado

un marcador de alta frecuencia en razas asiáticas lo que ha llevado a la conclusión de que la raza Blanca Cacerña descende más directamente del *Bos indicus* y del *Bos taurus primigenius*, antecesor del bóvido europeo.

Estudios previos podrían corroborar esta teoría, pues González y col., (1987) describieron que las distancias genéticas entre la raza Blanca Cacerña y otras 6 razas bovinas autóctonas españolas (Cárdena Andaluza, Alistana-Sanabresa, Sayaguesa, Morucha, Asturiana de los Valles, Asturiana de la Montaña) son muy elevadas con respecto, a los distancias existentes entre ellas.

2.2.- Conservación y funcionalidad.

El deterioro al que llegó la raza Blanca Cacerña en los años 60, se debió principalmente a la entrada masiva de razas foráneas con mejores rendimientos productivos, como la raza Charolesa (Bartolomé y García, 1998). Ante la certeza de su extinción, en 1970, el Ministerio de Agricultura creó un rebaño con 50 vacas y 1 toro en el Centro de Selección y Reproducción Animal de Badajoz (CENSYRA) agrupando los pocos animales que se conservaban en pureza. En ese mismo año se abrió un libro de registro de los efectivos censados y en el año 1974, pudo iniciarse un programa de cesión de reproductores para contribuir a la difusión de la raza, de tal modo que en 1984 ya había inscritos 537 ejemplares (165 machos y 372 hembras), pertenecientes a cinco ganaderías (Calero y col., 2002).

En 1975, se creó el primer banco de semen específico de la raza y en 1979, el antiguo Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, estableció el Catálogo Oficial de Razas de Ganado de España (O.M. de 30 de junio de 1979) en el que se incluyó a la raza Blanca Cacerña, como raza autóctona de protección especial y posteriormente como raza en peligro de extinción (Anexo I del Real Decreto 2129/2008 de 26 de diciembre).

Desde entonces se han venido realizando actividades de recuperación y conservación, localizando ganaderías y animales en pureza, valoraciones morfológicas y funcionales, programas de cesión de sementales y de inseminación, controles sanitarios, estudios citogenéticos y controles de paternidad, análisis de cruzamientos genéticos para evitar problemas de consanguinidad. En 1991, se amplía el banco de

germoplasma, con la colecta y congelación de embriones, con el fin de conservar la mayor variabilidad genética posible y realizar transferencias a hembras de otras razas (Bartolomé y García, 1998; Calero y col., 2007).

Posteriormente se tomaron otra serie de medidas institucionales, como la creación de la Asociación Nacional de Ganado Vacuno de Raza Blanca Cacerña y el libro Genealógico en julio de 1995 regulado por Decreto 295/2011 de 16 de diciembre por el que se aprueba la reglamentación específica del Libro Genealógico, Programa de mejora en su modalidad de conservación, control de rendimientos y evaluación genética de la raza autóctona en peligro de extinción: Raza Blanca Cacerña.

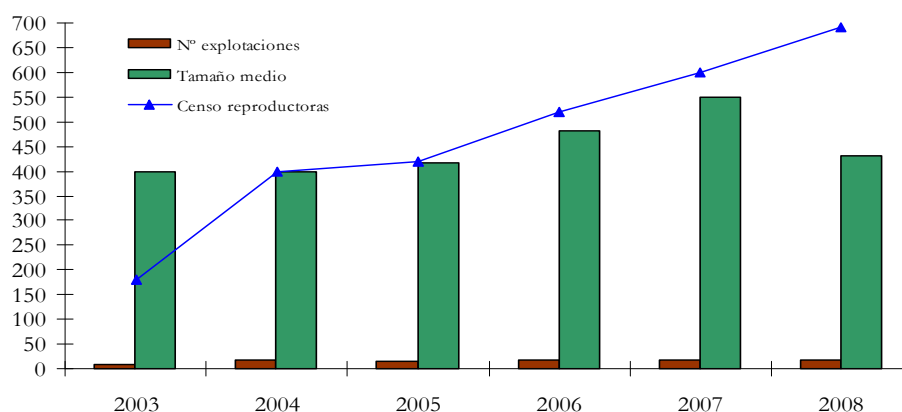


Figura 14. Evolución del número de reproductoras de la raza Blanca Cacerña. (Romero, 2009).

Gracias a los esfuerzos del antiguo Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, CENSYRA, la Asociación Nacional de Ganado Vacuno de Raza Blanca Cacerña, la Universidad de Extremadura y el Colegio Oficial de Veterinarios de Cáceres existen en la actualidad 24 sementales donantes en servicio en la Unidad de Reproducción del CENSYRA. El banco de germoplasma cuenta actualmente con 42.192 dosis de semen congelado de 78 reproductores y 82 embriones congelados (Datos no publicados, CENSYRA, 2013) y el censo de la raza se ha incrementado (Figura 14) en los últimos años hasta las 1.055 cabezas distribuidas en 28 ganaderías localizadas en las provincias de Cáceres y Badajoz (MAGRAMA, ARCA, 2014).

2.3.- Selección.

La mejora y la selección de la Blanca Cacerña, está enfocada hacia la conservación de la raza y la optimización de su rendimiento económico. El objetivo fundamental es conseguir un grupo de reproductores selectos, a partir de estudios de rendimientos (índice de transformación), análisis del material seminal, y la búsqueda e identificación de secuencias génicas. Para llevarlo a acabo, se realiza una ficha morfológica de cada animal inscrito en el libro de registro, valorando cada región anatómica tomando medidas zoométricas que servirán para actualizar los datos del estándar racial en algunos ejemplares (Bartolomé y García, 1998).

Al destete, las hembras son calificadas, mediante la valoración de los siguientes parámetros:

- Valoración productiva de la madre (intervalo entre partos).
- Crecimiento en la fase de lactación.
- Crecimiento durante la serie de testaje.
- Valoración morfológica.

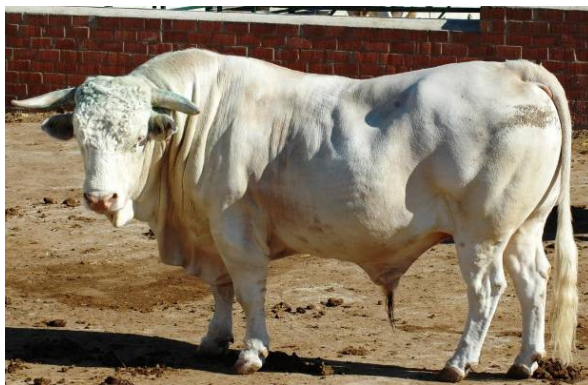


Figura.15. Semental de la raza Blanca Cacerña del CENSYRA de Badajoz.

En los machos (Figura 15), la calificación racial y morfológica definitiva se realizará a partir de los 24 meses de edad. Se califica como reproductor, cuando ha superado la prueba de testaje en el CENSYRA, la recría en la explotación y pruebas de control de rendimiento individual de los machos. Se recogen dosis seminales de todos los toros que hayan superado las pruebas de valoración individual, quedando al

menos cada año, un macho de cada ganadería, para disponer de un banco genético lo más amplio posible (Bartolomé y García 1998). En las hembras, en caso de observarse algún defecto que haga inviable su desarrollo como futura reproductora se contemplará su posible desecho. En caso de presentar taras, son sacrificados para el estudio de su aptitud carnicera basadas en los siguientes puntos:

- Rendimiento de la canal.
- Rendimiento piezas nobles.
- Caracteres organolépticos de la carne.
- Terneza y palatabilidad.

A los individuos puros aprobados como reproductores, se les realiza el análisis directo del genoma con *RAPDs* (Random Amplification of Polymorphic DNA) para facilitar el diseño y ejecución de los cruzamientos dirigidos que minimicen la tasa de pérdida de variabilidad genética (Parejo y col., 1998).

2.4.- Manejo de la reproducción.

La raza Blanca Cacereña, se caracteriza por tener una madurez sexual tardía, fertilidad media, instinto maternal bueno y bajo porcentaje de partos difíciles. Las vacas suelen llegar a la pubertad entre los 14 y los 16 meses de vida, y se cubren por primera vez aproximadamente, a los 18 meses (Romero, 2009). La gestación suele ser mas corta que en el resto de la especie, entre 274 y 276 días, con intervalo entre partos de 406 días y los terneros son criados durante 6-7 meses, hasta el destete (Romero, 2009) El sistema reproductivo utilizado es la monta natural por contrato de cesión de machos (Figura16) dirigidos desde el CENSYRA (Bartolomé y García, 1998) intentando realizar cruzamientos no consanguíneos. También se están llevando a cabo, programas de sincronización de celo e inseminación artificial, así como la colecta y transferencia de embriones, por el CENSYRA pero los resultados de fertilidad son bajos.



Figura 16. Cruzamientos dirigidos en las instalaciones del CENSYRA de Badajoz.

Los principales problemas reproductivos tienen su origen en el escaso número de animales integrantes del rebaño original, y en la introgresión genética de otras razas bovinas y presenta menores respuestas a los tratamientos superovulatorios y menores cantidades de embriones recolectados que los señalados en otras razas bovinas (Rueda y col., 2011). En un estudio genealógico de la raza realizado por Parejo y col. (2008) estimaron un incremento de consanguinidad por generación del 2% y un valor medio de consanguinidad en la sexta generación del 12% (Tabla 1) lo que indica que en las generaciones actuales los niveles siguen siendo altos y podrían estar influyendo negativamente en la eficacia biológica de los individuos.

	Nº Individuos				Consanguinidad			
	Totales		Vivos		Totales		Vivos	
	Macho	Hembra	Macho	Hembra	F(x) media	$\Delta F(x)$	F(x) media	$\Delta F(x)$
Gen. parental	7	37	1	14	0		0	
1º Generación	6	23	1	8	0	0	0	0
2º Generación	5	30	0	7	0,0214	0,0214	0,0179	0,0179
3º Generación	9	26	3	15	0,0545	0,033	0,0556	0,0377
4º Generación	11	54	4	44	0,0922	0,0377	0,0884	0,0328
5º Generación	26	65	18	61	0,0917	-0,0005	0,0895	0,0012
6º Generación	41	55	26	44	0,1308	0,039	0,1229	0,0333
7º Generación	12	24	9	23	0,0828	-0,0479	0,0811	-0,0417
$\Delta F(x)$ media						0,0217		0,0204

Tabla 1. Estudio genealógico de la raza Blanca Cacerña (Parejo y col., 2008).

3.- EVALUACIÓN DEL SEMENTAL.

Cualquier causa que altere los índices reproductivos en una explotación debe detectarse y corregirse con la mayor brevedad posible por su repercusión directa en el

rendimiento económico de la explotación. Una prueba relativamente simple y de bajo coste económico es conocer la fertilidad del semental. Se basa en un examen clínico externo de los órganos genitales por palpación escrotal, testicular y peneana, e interno por exploración rectal del músculo uretral, ampollas del conducto deferente, vesículas seminales y próstata descartando traumatismos, posibles malformaciones, hiperplasias o hipoplasias de los mismos. A continuación se procede a la extracción seminal y al examen laboratorial que supervisará la fertilidad del eyaculado.

3.1.- Sistemas de recolección de semen.

Existen tres métodos de colección de semen: la vagina artificial, la electroeyaculación y la recogida *postmórtem*.

3.1.1.- Vagina artificial.

El uso de esta técnica es el método rutinario en los centros de inseminación de bovino por la gran similitud que tiene con la monta natural. Es un receptáculo imitador de la vagina de la vaca que provee estimulación térmica (temperatura) y mecánica (presión) para producir una eyaculación. Esta técnica consiste en colocar un animal que se deje montar, y en el momento del salto del semental, se efectúa una pequeña desviación del pene hacia la vagina artificial que albergará el eyaculado hasta el laboratorio donde se realizarán los exámenes pertinentes.

Según Arriola (1995) las ventajas más sobresalientes de esta técnica son:

- La obtención de eyaculados prácticamente idénticos a los producidos en monta natural.
- Buenas condiciones higiénicas.
- Gran rapidez de la técnica.
- Bajo coste económico del colector de semen.
- Bajo riesgo de lesión para el toro.

La dificultad principal de este método es el entrenamiento necesario de los machos para que se produzca la monta y la aceptación de la vagina, con la presencia de operadores.

3.1.2.- Electroeyaculación.

La electroeyaculación es la técnica de recogida seminal más utilizada en la raza de Lidia por su sencillez, rapidez y eficacia. Consiste en la estimulación eléctrica de centros nerviosos cercanos a las glándulas reproductivas accesorias y base del pene, por un electrodo situado en el recto conectado a un generador de impulsos eléctricos (Acosta y col., 1991; Arriola y col., 1989).

Para realizar este método (Figura 17), es necesario disponer de una manga de manejo o de un muevo de contención lo suficientemente resistente y seguro para inmovilizar al animal y a ser posible con suelo estriado o antideslizante para evitar caídas durante la estimulación (De la Fuente y col., 1994; Quevedo, 2008). Una vez fijado el animal se procede a la limpieza y exploración clínica del aparato genital. Tras realizar un ligero masaje para facilitar la posterior excitación, se introduce el estimulador en el recto. Este dispositivo posee en su parte ventral tres electrodos longitudinales que emiten de forma rítmica, estimulaciones a bajo voltaje dejando entre ellas pausas de dos segundos, que se van elevando gradualmente hasta conseguir la erección y posterior eyaculación.



Figura 17. *Proceso de colecta de semen por electroeyaculación a un toro de lidia en el muevo de contención.*

3.1.3.- Postmórtem.

La recolección de espermatozoides de la cola del epidídimo, es una técnica útil para propagar y preservar la calidad genética de toros *postmórtem*. Consiste en recuperar y criopreservar los espermatozoides, en casos donde, la colecta de semen por otros métodos es compleja (Anel y col., 2002) como en el caso de muerte natural o accidental de especímenes que estén en peligro de extinción, y en el caso concreto

de la raza de Lidia, tras un excelente comportamiento durante su lidia en la plaza de toros, por muerte tras el indulto, o por muerte repentina en el campo, del semental (Gaudioso y Riol, 1996; Anel y col., 2002; Quevedo, 2008).

La maduración, o desarrollo progresivo de la capacidad fertilizante de los espermatozoides sucede en la cabeza y el cuerpo del epidídimo y es en la cola de este último donde se almacenan (Amann y Schanbacher, 1983; Chung, 1997; Reyes-Moreno y col., 2000, 2002). La técnica consiste en, extraer los testículos del escroto y separar las colas epididimarias cortando la unión entre la base del testículo con el cuerpo del epidídimo y con el conducto deferente. Posteriormente la extracción de los espermatozoides se puede realizar por tres métodos:

- Recolección por flujo retrógrado: mediante corte transversal en el *septum* del epidídimo y perfusión (Figura 18).
- Recolección por desmenuzamiento de la cola del epidídimo: se corta finamente y se filtra la cola del epidídimo, para obtener el material seminal.
- Método mixto: perfusión más desmenuzamiento.

Es fundamental para la supervivencia espermática, el manejo del epidídimo y el tiempo transcurrido desde la muerte hasta la congelación de los gametos (Malcotti y col., 2012) pero, siempre y cuando los órganos sean refrigerados inmediatamente tras la extracción, la obtención de los espermatozoides epididimarios se puede retrasar varias horas (Gerber y col., 2002; Malcotti y col., 2012). Este material seminal puede ser utilizado en inseminación artificial o fertilización *in vitro* para conseguir descendientes de alto valor genético (Barrios, 2002).



Figura 18. Extracción postmórtem de semen de toro por flujo retrógrado. Testículo (a). Epididimo (b). Extracción por flujo retrógrado(c).

3.2.- Inseminación artificial.

Las técnicas de reproducción asistida o métodos *ex situ*, preservan recursos genéticos fuera de su hábitat normal, mediante la colección y conservación de genomas vivos (semen, ovocitos, embriones y ADN) que permiten paliar, o detener la pérdida de un importante caudal genético.

Para salvaguardar el futuro de algunos encastes de la raza de Lidia y de la raza Blanca Cacereña se están incorporando tecnologías eficazmente contrastadas en otras razas, como la inseminación artificial (IA) y la transferencia de embriones y en algún caso aislado la clonación pero de una manera puramente experimental. Actualmente la herramienta más exitosa, es la inseminación artificial (Figura 15). Según De la Fuente, y col., (1994) las ventajas de esta técnica son:

- Conservación prolongada de material fecundante de animales valiosos.
- Eliminar las limitaciones de manejo y/o sanitarias que impedirían la utilización de algunos individuos.
- Aceleración de la selección genética.
- Transferencia de material genético entre ganaderías que se encuentren geográficamente distantes.
- Facilitar la comprobación de la descendencia.
- Obtención de beneficios económicos con la comercialización del semen, en ganaderías élite.

El principal factor limitante del empleo de esta técnica son los bajos resultados de fertilidad obtenidos hasta el momento. Otros factores restrictivos son:

- Riesgo de infertilidad por mala detección del estro y mala técnica de inseminación (Mclure, 1994).
- Intensa reacción de estrés en animales muy agresivos y poco habituados a la interacción con el ser humano (Buxadé, 1996).

- Carencia de pruebas *in situ*, para la evaluación de la calidad seminal (Rodríguez-Martínez, 2007).
- Alta variabilidad en la calidad seminal, entre sementales y entre eyaculados (Colenbrander y Gadella, 2003).
- Disminución del potencial fértil de las dosis seminales derivado de la criopreservación del semen. El proceso de congelación-descongelación, provoca un daño irreversible en aproximadamente el 50% de los espermatozoides de la dosis (Watson, 1995; Holt, 2000).
- Problemas asociados a la consanguinidad.

Para asegurar el asentamiento y la continuidad de programas de IA en las ganaderías de extensivo, debe interferir mínimamente en el manejo habitual, no resultar demasiado costoso, y conseguir buenas tasas de fertilidad (De la Fuente y col., 1994).

4.- DEFECTOS DE LOS ESPERMATOZOIDES.

Los análisis de volumen, concentración, movilidad y morfología de los espermatozoides, son particularmente eficaces para eliminar los eyaculados o dosis de mala calidad. Pero si las anomalías existentes en el espermatozoide no son evidentes o difícilmente detectables en un análisis clásico seminal, el toro podría ingresar en una prueba de progenie y/o utilizarse en IA.

Las anomalías de los espermatozoides se pueden clasificar en “compensables” y “no compensables” (Saacke y col., 1994, 2002). Los defectos compensables, son aquellos que dan lugar a fallos en la fertilización pero pueden ser compensados al incrementar el número de espermatozoides en la dosis inseminante, como:

- Viabilidad espermática.
- Anomalías morfológicas.
- Características de funcionalidad (movilidad, concentración y duración de los espermatozoides en el reservorio oviductal, reacción acrosómica).

Por el contrario, los defectos no compensables, engloban aquellos cuya presencia no limita el tránsito de los espermatozoides, ni la probabilidad de fecundación, pero causan deficiencias en la fertilización del oocito o en el progreso embrionario (Des Daas, 1992):

- Daños en el ADN espermático.
- Mutaciones cromosómicas.
- Defectos en la morfología de la cabeza del espermatozoide.

5.- EVALUACIÓN DE PARÁMETROS SEMINALES.

El espermatozoide es una célula altamente especializada y con una función biológica compleja, influenciada por factores externos *in vitro* (tratamientos seguidos en el laboratorio para su conservación) o *in vivo* (cambios en el medio a lo largo de su paso por el tracto reproductor de la hembra) que requiere el análisis de diversas características físicas para poder determinar el potencial de fertilidad.

En el análisis rutinario de campo se evalúa, el aspecto, volumen, movilidad, concentración anomalías morfológicas y viabilidad espermática de forma rápida, simple (Figura 20) y con un coste moderado (Centola y Ginsburg, 1996). Pero tras el examen tradicional se pueden evaluar otros factores que permitan mejorar la capacidad de predicción de la capacidad fecundante de los espermatozoides como el estudio de características seminales no compensables, entre las que figura la fragmentación del ADN espermático.

5.1.- Aspecto y volumen.

El eyaculado de toro, es un líquido denso, cremoso, ligeramente amarillento, que contiene una suspensión de espermatozoides en plasma seminal (Figura 19). La determinación del aspecto y del volumen se realiza justo tras la extracción y nos facilita información esencial del eyaculado. Se verifica la ausencia de pelo, suciedad y contaminantes externos que supondría la eliminación de la muestra. El aspecto opaco o translúcido nos muestra de una forma grosera la alta o escasa concentración espermática del eyaculado y si el aspecto es lechoso o tiene fragmentos de material,

nos muestra la posible presencia de un proceso inflamatorio en el tracto reproductivo que sería causa obligatoria de eliminación.

El volumen medio establecido para el ganado bovino es de 4-6 cm³ con una variación de entre 1-15 cm³. Concretamente los toros jóvenes pueden suministrar de 1 a 3 cm³ de semen, mientras que los adultos (11-13 años) pueden eyacular de 10 a 15 cm³ (Hafez, 1989). Se debe tener en cuenta que pueden presentarse variaciones en función del método de recogida, estado fisiológico del macho, raza, tamaño corporal, alimentación y régimen sexual al que se le somete (Derivaux, 1982).



Figura 19. Eyaculado de toro de lidia en el tubo colector.

5.2.- Concentración espermática.

La concentración espermática viene definida como el número de espermatozoides por unidad de volumen (expresado normalmente en millones por ml) del eyaculado. La concentración media para el ganado bovino es de 2×10^8 espermatozoides/ml en jóvenes y de $1,8 \times 10^9$ espermatozoides/ml en los adultos (Hafez, 1989), pero existe una alta variabilidad entre toros, e incluso entre distintos eyaculados de un mismo toro.

La concentración puede calcularse por varios métodos, la espectrofotometría (Figura 20), la colorimetría, la citometría de flujo y el uso de cámaras de recuento celular como la de Bürker®, Neubauer® o Makler® (Woelders, 1990). La espectrofotometría es la técnica más empleada tanto en condiciones de campo como en centros de inseminación, por su rapidez, simplicidad y coste. Se basa en una tabla de conversión en la que se asigna a cada valor de transmitancia un valor de

concentración previamente calculado mediante recuento directo o contador de partículas (Sorensen, 1982).



Figura 20. *Análisis de parámetros seminales clásicos de toro en condiciones de campo.*

5.3.- Movilidad espermática.

La movilidad espermática es un parámetro fundamental para el transporte espermático y la capacidad de penetración del ovocito. Este parámetro no pronostica de forma precisa la capacidad fecundante del espermatozoide, pero refleja una de las funciones primordiales del espermatozoide, la actividad flagelar.

Existen varias formas de evaluación de la movilidad espermática:

- Movilidad masal: movimiento de superficie que refleja el vigor de las ondas que produce la masa espermática en movimiento.
- Movilidad individual: se observa el porcentaje de células móviles de una muestra y la calidad del movimiento.
- Movilidad progresiva: es el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo.

El estudio de la movilidad espermática se puede realizar por dos métodos el más utilizado es la valoración subjetiva que consiste en evaluar el porcentaje de espermatozoides móviles, así como, el tipo de movimiento que presentan de forma inmediata y económica. Es de gran valor cuando lo realizan personas experimentadas sin embargo, la exactitud y precisión están limitadas en función de las condiciones del sistema de medida y de la destreza del observador (Graham y col., 1980).

El otro método, se basa en el uso de sistemas informatizados de digitalización de imágenes denominados CASA (Computer Assisted Motility Analysis) (Davis y Siemers, 1995). Capturan el movimiento espermático y lo analizan, tanto en tiempo real, como de manera diferida, aportando un gran volumen de información (Tuli y col., 1992), pero presenta inconvenientes por el coste elevado, el análisis de un número bastante limitado de espermatozoides y la posible predisposición a un cierto grado de tendencia por parte del técnico.

Para conocer qué método es más objetivo, Januskauskas y col., (2001) realizaron un análisis de la movilidad post-descongelación con la valoración subjetiva y el análisis informatizado y los resultados no difirieron significativamente. En ambos casos hubo correlaciones positivas entre movilidad y fertilidad.



Figura 21. Espermatozoides observados al microscopio óptico de contraste de fases ($\times 20$).

5.4.- Anomalías morfológicas.

El análisis morfológico de los espermatozoides es una prueba de control de calidad que refleja el estado fisiológico o patológico de la funcionalidad de los testículos, epidídimos y glándulas accesorias del semental. Se producen por una espermatogénesis o espermiogénesis defectuosas, por herencia, enfermedades, estrés por calor o frío, exposiciones a condiciones medio ambientales adversas, reposo sexual prolongado (mayor de 60 días) o por el uso de técnicas inadecuadas en la manipulación del semen (Barth, 2000).

Las anomalías del espermatozoides han sido tradicionalmente clasificadas en función de:

- La morfología: cabeza, cola, pieza intermedia y presencia de gotas citoplasmáticas. (acúmulos de citoplasma no reabsorbido en el proceso de maduración del espermatozoide).
- La importancia: defectos mayores y menores (Blom, 1983).
- El origen: primarias, originadas durante la espermiogénesis en el testículo y secundarias: originadas en el epidídimo o post eyaculación (Barth y Oko, 1989) (Tabla 2).

Indistintamente de su clasificación, generalmente se acepta que no deben existir más de un 30% de anomalías morfológicas en los recuentos efectuados.

La valoración de la morfología del espermatozoide se basa en la relación directa que hay entre la proporción de espermatozoides anormales en el eyaculado, el tipo de defecto morfológico y su relación con la fertilidad *in vivo* de los toros y se ha correlacionado significativamente (Söderquist y col., 1991).

Se pueden utilizar técnicas de valoración subjetiva (Amann, 1993) con diversas tinciones (Eosina-Nigrosina, Papanicolau, Giemsa, Diff-Quik), por fijación con glutaraldehído o formaldehído de la muestra y a continuación se realiza la valoración por microscopía de contraste de fases. Pero para adquirir datos objetivos acerca de la morfometría de la cabeza de los espermatozoides se ha desarrollado el análisis automatizado de la morfología espermática, ASMA (Computer Assisted Sperm head Morphometry Analysis) que es un sistema de análisis de imágenes computerizadas que permite detectar y cuantificar las anomalías correctamente y realizar mediciones repetibles y objetivas (Amann, 1981; Gravance y col., 1998).

Tabla 2. Esquema de anomalías morfológicas de los espermatozoides adaptado y actualizado de “XX *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*”. Barth AL, Oke RJ. Iowa State University Press, Iowa. 1989.

PRIMARIAS		
Anormalidades de cabeza	Anormalidades de cuello	Anormalidades de la cola
Cabezas gigantes	Unión del cuello fuera del eje (descentrado)	Cola corta (defecto de la cola en muñón)
Cabezas pequeñas	Cuello doble	Colas abaxiales, accesorias o múltiples
Cabezas periformes	Cuello en espiral	Pieza media doblada, hinchada, abaxial, incompleta
Cabezas cónicas y estrechas	Cuello deshilachado, granular o hinchado	Aplasia segmentaria de la pieza media y defectos de la vaina mitocondrial
Anormales desprendidas		Gota citoplasmática proximal
Formas teratoides		Defecto Dag
Defectos de acrosoma		
Vacuolas nucleares		
Condensación anormal del ADN		
SECUNDARIAS		
Anormalidades de cabeza	Anormalidades de la cola	Otras células
Cabezas normales desprendidas	Pieza media distal doblada	Células epiteliales
Acrosoma roto, deforme o desprendido	Pieza principal doblada	Eritrocitos
	Pieza principal doblada por shock hipotónico	Formaciones de medusa
	Gota citoplasmática proximal y distal	Células precursoras de espermatozoides
		Células redondas
		Glóbulos blancos

5.5.- Viabilidad espermática.

Este análisis se basa en la determinación de la proporción de espermatozoides vivos y muertos en función de la permeabilidad de membrana. Existe una alta correlación entre el número de células viables en una dosis de inseminación y la capacidad de fecundar a los ovocitos *in vivo* (Amann, 1993; Shannon y Vishwanath, 1995; Des Daas y col., 1998).

En el procesado de criopreservación del semen, se produce un estrés térmico para el espermatozoide que afecta a sus membranas, (membrana plasmática, membrana externa del acrosoma y membranas mitocondriales) produciendo modificaciones en la organización, fluidez,

permeabilidad y composición lipídica causando daños irreversibles y comprometiendo su supervivencia (Watson, 1981; Thomas y col., 1998).

Hoy en día, se utilizan técnicas precisas para valorar la viabilidad espermática que consisten en el marcaje fluorescente del ADN, el estudio de determinadas enzimas intracitoplasmáticas o la medición del potencial de membrana.

6.- ESTRUCTURA DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA.

La cromatina es una estructura sumamente organizada y compacta, que consiste en ADN y nucleoproteínas heterogéneas (Ward y Zalensky, 1996). Esta organización permite, la replicación del ADN de forma adecuada, para que la información genética sea transmitida a la próxima generación (Ward y Coffey, 1991).

En el núcleo de las células somáticas de los mamíferos, el ADN rodea a los octámeros de histonas, organizando los nucleosomas que a su vez forman solenoides, lo cual induce el superenrollamiento del ADN (Figura 22). Sin embargo el núcleo del espermatozoide, tiene una estructura nucleoproteínica muy específica (Wykes y Krawetz, 2003; Biegeleisen, 2006) formada por ADN y proteínas básicas, distintas a las histonas, denominadas protaminas necesarias para mantener la capacidad de fertilización (Hecht, 1998; Brewer y col., 2002). Las protaminas están involucradas en el empaquetamiento final del ADN espermático y en la condensación apropiada, lo que probablemente estabiliza el ADN y lo hace menos vulnerable frente a cualquier tipo de daño (Ward, 1993; Brewer y col., 1999; Balhorn y col., 2000; Brewer y col., 2002; Corzett y col., 2002; Brewer y col., 2003; Meistrich y col., 2003). Algunas especies de mamíferos presentan sólo un tipo de protamina en sus espermatozoides mientras que en otras especies existen dos tipos: Protamina 1 (PRM1 o P1) y Protamina 2 (PRM2 o P2).

Se ha descrito la familia de la protamina 1 (P1) en todos los mamíferos (McKay y col., 1985; Mengual y col., 2003; Yoshii y col., 2005) y la familia P2 (formada por un compendio de otras protaminas) presente en los primates y roedores (Biegeleisen, 2006). El espermatozoide de caballo, lagomorfos y proboscidos contiene la protamina P2 procesada (Balhorn y col., 1977; McKay y col., 1985; Oliva y Dixon, 1990; Yoshii y col., 2005) y en el toro y el verraco está presente el gen para la protamina P2 pero parecer ser que es disfuncional o produce una proteína aberrante (Balhorn, 2007; Gosálvez y col., 2011c). Las variaciones en la expresión de las protaminas han sido asociadas con la infertilidad masculina. Normalmente las familias de protaminas P1 y P2 aparecen en una proporción P1/P2 que varía dentro de los mamíferos euterianos (Corzett y col., 2002). Se expresan en una proporción 1:1 en espermatozoide humano, y en ratones la cantidad de P2 duplica la de P1 (2:1) (Corzett y col., 2002) proporcionando

un embalaje adecuado del ADN espermático. La desestabilización de la proporción P1/P2 está altamente correlacionada con el incremento de la fragmentación del ADN espermático, generando fallos en la fertilización, mala calidad embrionaria y tasas bajas de embarazo (Simon y col., 2011; García- Peiró y col., 2011; Fortes y col., 2012; Aoki y col., 2013).

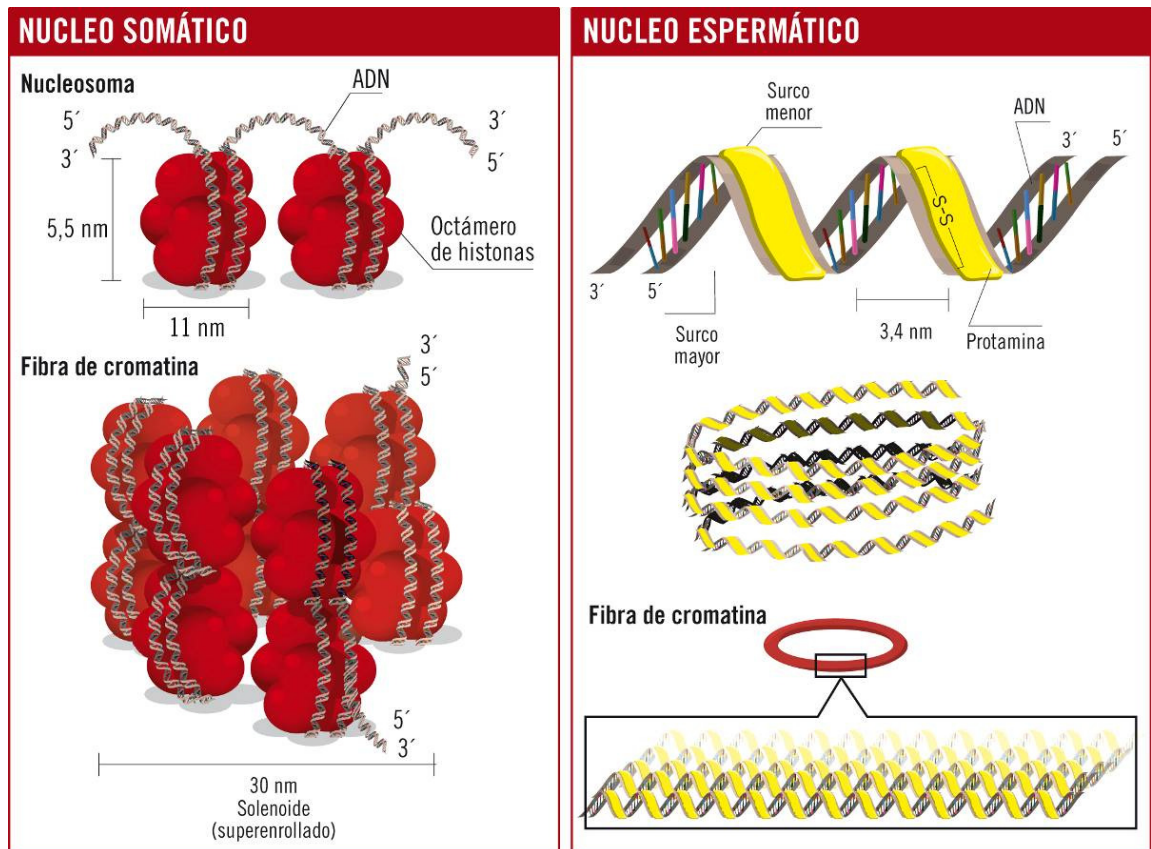


Figura 22. Estructura del ADN de una célula somática y una célula espermática.

Durante la espermatogénesis los espermatozoides sufren un proceso de maduración en el epidídimo y se produce el cambio de espermatogonias diploides a espermatozoides maduros haploides. Este proceso de maduración conlleva el empaquetamiento de la cromatina nuclear y la adquisición de la movilidad espermática. El núcleo de la espermátida va a sufrir alteraciones complejas, de tipo bioquímico y fisiológico, así como cambios drásticos en su morfología, tamaño y condensación.

La estabilización del núcleo espermático sucede durante las dos últimas fases de transición de la espermátida, proceso en el que las actividades de transcripción y reparación están inactivadas (Kierszenbaum, 2001; Brewer y col., 2003). Entre los cambios en el complejo ADN-proteína destacan la eliminación de la organización nucleosomal de la cromatina y la adquisición de una conformación toroidal fuertemente empaquetada que puede contener hasta 60 Kb de ADN, unas seis veces más compactado que en el cromosoma mitótico (Sakkas y col., 1999). Las histonas sufren una hiperacetilación, siendo sustituidas por unas variantes específicas de las histonas y reemplazadas por las proteínas nucleares de transición. Posteriormente, las protaminas 1 y 2, sustituirán a las proteínas de transición, interaccionando con el ADN y compactándolo de nuevo por puentes disulfuro covalentes intra e intermoleculares que estabilizarán rígidamente la estructura impidiendo la expresión génica (Bellve y col., 1975; Poccia, 1986; Fuentes-Mascorro, y col., 2000; Meistrich y col., 2003).

Durante el cambio en el complejo ADN-proteína, aparecen roturas endógenas y transitorias de cadena simple o cadena doble cuya función, es la eliminación del superenrollamiento (Evenson y col., 2002). Una vez que la protaminación se completa, estas “roturas biológicamente correctas” serán reparadas por tres complejos de proteínas altamente especializadas (Polo y Jackson, 2011).

Una vez que se produce la penetración del espermatozoide en el oocito, éste debe remodelar la cromatina condensada del espermatozoide en su forma activa y accesible. De nuevo, este cambio, implica un proceso estricto secuencial de descondensación, que es iniciado por la pérdida de las protaminas nucleares y el reemplazo por las histonas. (Shimada, y col., 2000; Nakazawa, y col., 2002; Mclay y Clarke, 2003). Finaliza una vez que las histonas vuelvan a provocar el superenrollamiento del ADN.

En resumen, la capacidad funcional del espermatozoide incluye una correcta condensación cromatínica durante la espermiogénesis, la estabilización de la cromatina durante la maduración espermática epididimaria y después de la penetración dentro del oocito, la descondensación correcta tras la fecundación (Hingst y Blottner, 1995).

7.- LESIONES DE LA CROMATINA ESPERMÁTICA.

El estado físico de la cromatina espermática es crítico a la hora de proporcionar un buen empaquetamiento, protección del ADN espermático y capacidad de descondensación tras la fertilización (Evenson, 1980). Se ha demostrado que altos niveles de daño en la cromatina afecta al éxito reproductivo, en condiciones naturales y con técnicas de reproducción asistida (Evenson, 1999; Spano y col., 2000; Larson y col., 2000). La inestabilidad cromatínica podría retrasar la formación nuclear paterna, la calidad embrionaria, la proporción de blastocistos, la implantación y el éxito en el embarazo o preñez. (Evenson, y col., 1994; Agarwal y Allamaneni, 2004; Virro y col., 2004; Muriel y col., 2006; Núñez-Calonge y col., 2012). En animales, cuando se ha inducido daño en el ADN de la línea germinal paterna, se ha encontrado una fuerte asociación entre este daño y el desarrollo embrionario incluyendo efectos sobre las nuevas generaciones nacidas y subsecuentes (Fernández-González y col., 2008).

Se ha demostrado que determinados factores extrínsecos también dañan a la molécula de ADN, tales como, la abstinencia sexual durante un periodo de tiempo largo (Gosálvez y col 2011d), la edad (Ji Bt y col., 1997; Mandal y col., 2010), los componentes del diluyente seminal y las condiciones de almacenamiento (Waterhouse y col., 2010).

Determinadas situaciones clínicas, también pueden dañar el núcleo espermático, como el criptorquidismo, la orquitis (Foresta y col., 1989), el varicocele (Allamaneni y col., 2004; Enciso y col., 2006a; García-Peiró y col., 2012; Gosálvez y col., 2013), el cáncer (Meseguer y col., 2008; Cortés-Gutiérrez y col., 2011, 2013), la fiebre elevada (Sergerie y col., 2007) infecciones genitales por *Chlamydia trachomatis* y *Mycoplasma spp.* (Gallegos y col., 2008) infecciones de tipo vírico (Chang y col., 2004; Sang-Myeong y Kleiboeker, 2007), leucocitospernia (Erenpreiss y col., 2002; Rodríguez y col., 2012), enfermedades inflamatorias del tracto genital, hipertermia testicular (Acevedo, 2001; Zini y Libman, 2006; Ruiz-López y col., 2010) presencia de bacterias en el eyaculado, como *Mycoplasma spp.* (González-Marín y col., 2011; Rybar y col., 2012) y elevados niveles de zinc en la dieta (García- Contreras y col., 2011).

También se ha demostrado que provocan inestabilidad cromatínica, algunos quimioterápicos del tipo ciclofosfamidias, (Coddington y col., 2004) la exposición a organofosforados (Sánchez-Pena y col., 2004), las radiaciones ionizantes (Fatehi y col., 2005) los rayos gamma, los rayos X (Sailer y col., 1995) el uso de ciertos fármacos y drogas (Ji Bt y col., 1997), la contaminación (Selevan y col., 2000; Evenson y Wixon, 2005; Rubes y col., 2005; Specht y col., 2012), el tabaquismo (Potts y col., 1999) y algunos tóxicos químicos como la triethlenemelamina y el methyl methanesulfonato (Evenson y col., 1993).

También se han descrito factores intrínsecos responsables de la fragmentación del ADN espermático:

- Espermatogénesis defectuosa: Deficiencias durante la recombinación, maduración espermática anormal y/o protaminación deficiente.
- Apoptosis celular.
- Estrés oxidativo.

Tal como han propuesto diversos autores, probablemente existen muchos más mecanismos, actualmente desconocidos, por los que se puede fragmentar el ADN y puedan tener una relación muy directa con la diagnosis clínica de un cuadro de infertilidad inespecífico.

7.1.- Espermatogénesis defectuosa.

Durante el transporte de los espermatozoides a través del epidídimo se pueden producir roturas endógenas de la molécula de ADN en los espermatozoides, por:

- Errores durante la recombinación celular: Una vez que se producen las roturas programadas genéticamente en la molécula de ADN, a veces, se originan enlaces cruzados no programados de ADN-ADN y ADN-proteína en la cromatina compactada de los espermatozoides maduros, provocando un superestabilización que impide la descondensación de la cromatina (Bennetts y col., 2008).
- Maduración espermática anormal: Durante la eliminación del superenrollamiento de la fibra de ADN, las roturas “biológicamente correctas”,

no son reparadas y aparecen en el eyaculado espermatozoides con fragmentación en su ADN (Mengual y col., 2003).

- Protaminación deficiente: las deficiencias en la expresión de protaminas durante la espermiogénesis, se han asociado con niveles elevados de fragmentación del ADN espermático e infertilidad humana. Se ha descrito que las proporciones P1/P2 distintos a 1, proporciones anormalmente elevadas o reducidas de P1/P2 o alteraciones en la expresión de P1 o incluso la ausencia completa de P2, pueden dar lugar a daños en el ADN espermático en humanos (Balhorn, 2007; Aoki y col., 2013).

7.2.- Apoptosis.

El proceso apoptótico daña el ADN y contribuye a una pobre calidad espermática (Aitken y Koppers 2011). Durante el proceso de formación de las espermátidas en las paredes de los túbulos seminíferos del testículo se produce la apoptosis continuamente (Tomlinson y col., 2001; Erenpreiss y col., 2002). Las células de Sertoli, presentes también en las paredes de dichos túbulos, fagocitan y limpian los residuos celulares. Sin embargo, las células que se escapan del proceso de apoptosis, y tienen su ADN fragmentado, pueden conservar la capacidad de diferenciarse en un espermatozoide maduro funcional, que puede alcanzar el ovocito y conseguir la fertilización (Fischer y col., 2003; Sakkas y col., 2004). Además, estos espermatozoides generan una serie de metabolitos en el líquido seminal, que podrían acelerar el proceso de degradación del ADN de otros espermatozoides tras la eyaculación. Esta situación es especialmente crítica durante el proceso de criopreservación del semen. Se inducen desórdenes de membrana y muerte celular que generan un acúmulo no deseable de metabolitos altamente reactivos, como enzimas celulares, enzimas procedentes del acrosoma, nucleasas y enzimas de remodelación de la cromatina, que pueden ser activas sobre los núcleos espermáticos normales. Sin embargo, en un estudio realizado sobre células espermáticas de bovino, la criopreservación provocó cambios importantes en todos los marcadores apoptóticos de la célula excepto en aquellos concernientes al núcleo (Martín y col., 2004).

7.3.- Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo es uno de los mecanismos principales relacionado con el daño en el ADN espermático y la infertilidad (Sharma y Agarwal, 1996; Saleh y Agarwal, 2002). Se produce por el exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) al disminuir la capacidad antioxidante del plasma seminal.

Los espermatozoides de los mamíferos producen radicales libres de oxígeno, necesarios para modular la proliferación, diferenciación y función celular normal, como la capacitación y la reacción acrosómica, pero el aumento de la concentración del metabolito puede modificar las funciones celulares y/o poner en peligro la supervivencia celular (Aitken y col., 1997; Moustafa y col., 2004). Los daños derivan de la depleción del ATP, lo que conduce a, una fosforilación insuficiente del axonema del espermatozoide, a la peroxidación lipídica, pérdida de movilidad, pérdida de viabilidad y daños en la molécula de ADN (Aitken y Krausz, 2001; Agarwal y Allamaneni, 2004; Aitken y col., 2012).

Se produce principalmente por la presencia de espermatozoides inmaduros, de células epiteliales del epidídimo, por la presencia de leucocitos y por fallos en la capacidad antioxidante, perjudicando la integridad del ADN y su capacidad de fertilización (Aitken y col., 1992; Fischer y col., 2003; Moustafa y col., 2004). De hecho, existe una correlación positiva entre altos porcentajes de gotas citoplasmáticas en el eyaculado y la desnaturalización del ADN de los espermatozoides (Fischer y col., 2003; Enciso y col., 2011a). Para contrarrestar esta producción excesiva de ROS, se han realizado ensayos de suplementación oral con antioxidantes en el hombre, que han generado descensos en el índice de fragmentación del ADN espermático (Zini y col., 2009; Abad y col., 2013).

8.- FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO.

Se identificó por primera vez, en toros con baja fertilidad en 1966 al comprobar mediante la reacción de Feulgen, que los espermatozoides presentaban el complejo ADN-proteína anormal (Gledhill, 1966). La coloración intensa de la cabeza del espermatozoide, se asociaba a una alta densidad de ADN por una compactación elevada de la cromatina y por tanto, una menor sensibilidad a la hidrólisis y viceversa.

Posteriormente, Calvin y Bedford en 1971 relataron el papel que jugaban los puentes disulfuro en la compactación de la cromatina de los espermatozoides y las diferencias existentes con respecto a la línea somática (Ward y Coffey 1991; Ward, 1993). Estos estudios fueron cobrando más interés, cuando se comenzó a asociar problemas de infertilidad inespecífica con alteraciones de la estructura del núcleo del espermatozoide (Evenson, 1983).

Actualmente está totalmente demostrado que la fragmentación del ADN espermático presenta una alta correlación con la infertilidad masculina. Diferentes autores proponen que si el IF de una muestra seminal humana supera el 30%, la fertilidad de ese eyaculado está muy comprometida (Evenson, 1999; Evenson y Wixon, 2006; Bungum y col., 2007). También afecta a la fertilización del oocito, a la calidad del embrión, a su desarrollo hasta blastocisto, e incluso a la implantación, siendo una de las causas principales de pérdidas embrionarias tempranas por desarrollo anormal embrionario (Virro y col., 2004; Muriel y col., 2006; D'Occhio y col., 2007; Núñez-Calonge y col., 2013).

Sin embargo existen mecanismos de reparación de la célula espermática con ADN fragmentado de manera que puede ser reparado, reparado de forma aberrante o no ser reparado. En todos los casos, puede tener capacidad para fertilizar el oocito. Los mecanismos de reparación pueden activarse durante la espermiogénesis, una vez que el oocito ha sido fertilizado, en el cigoto, durante el desarrollo embrionario y antes o después de la implantación del embrión. Pero únicamente pueden reparar una cantidad limitada de daño en el ADN espermático (Ahmadi y Ng, 1999; Derijck y col., 2008; González-Marín y col., 2012a).

Si durante la espermiogénesis, las roturas en el ADN celular persisten, pueden conducir a la inestabilidad genómica y las células podrían sufrir apoptosis o senectud para prevenir la acumulación potencial de mutaciones tumorigénicas. Si la respuesta al daño falla, aparecerán de nuevo esas mutaciones (Wang y col., 2012) condicionando la estabilidad de los cromosomas en las siguientes divisiones celulares, pudiendo ser transmitidas en el momento de la fecundación y provocar una pérdida de funcionalidad celular, incompatible con la formación de un embrión normal y el desarrollo fetal (Evenson, y col., 2002; Silva y Gadela, 2006).

En respuesta al daño en el ADN, la integridad del genoma es controlada por una red celular muy sofisticada, donde tres complejos de proteínas distintos, actúan como sensores, transductores y efectores de esta respuesta (Polo y Jackson, 2011). Los componentes de estos tres complejos, actúan recíprocamente entre sí y consiguen resultados diferentes dependiendo de la severidad del daño y del tipo de célula. De no ser reparadas, las roturas persistirán y una vez que el espermatozoide alcanza la madurez, la reparación del daño en el ADN ya no será posible (Dadoune, 2003).

Si el daño en el ADN no se repara, o si sucede en el espermatozoide por factores extrínsecos, el daño puede ser reparado durante la fertilización, dependiendo del nivel de fragmentación de ADN que presente (Ashwood y Edwards, 1996), pueden darse tres situaciones:

1.- El oocito es capaz de reparar las roturas de la molécula de ADN del espermatozoide antes de iniciar la primera división celular y se generará un descendiente normal. Se cree que la reparación de ADN en el embrión recién fertilizado, es debido al ARNm materno y a las proteínas depositadas y almacenadas en el oocito antes de la ovulación. Los genes de reparación del ADN, se expresan en las primeras etapas del desarrollo. Durante la formación del cigoto también existen mecanismos de reparación, pero vinculados a la transición de la expresión génica reparadora de la madre, para apoyar al cigoto antes de la formación del genoma embrionario (Derijck y col., 2008).

2.- La maquinaria de reparación del oocito no es suficiente para reparar el daño, o si la expresión génica del cigoto no comienza en el tiempo correcto, el embrión puede fallar en su desarrollo, en la implantación o puede ser abortado naturalmente en una etapa posterior (Jurisicova y Acton, 2004).

3.- El oocito realiza una reparación parcial. Esto da lugar a errores en la secuencia de ADN que pueden dar lugar un descendiente anormal. Se ha postulado, la posible presencia de daño en el ADN en embriones generados *in vivo* e *in vitro*, para explicar el fracaso en su desarrollo después de la implantación de embriones con cariotipos normales. Otros estudios, sugieren que durante la preimplantación

también hay pérdida de embriones, entre la activación del genoma postembrionario y la etapa de blastocisto (Shoukir y col., 1998). Otros proponen que, este tipo de daño puede ser expresado durante y/o después de la implantación y ha sido caracterizado como el efecto paterno tardío (Borini y col., 2006). Esto se corrobora con los fracasos en la obtención de blastocistos al utilizar muestras espermáticas con altos niveles de daño en el ADN (Seli y col., 2004). Pero la situación más grave puede suceder durante la embriogénesis, por los errores derivados del daño en el ADN, durante la replicación, la transcripción y la traducción del ADN, contribuyendo al desarrollo de futuras enfermedades que afectarán no sólo al futuro individuo (Cooke y col., 2003) sino a las generaciones siguientes (Aitken y col., 2009).

En el mundo animal, también se correlacionan las alteraciones de la cromatina con la infertilidad en la especie bovina (Ballachey y col., 1987; Karabinus y col., 1990), caprina (Sailer y col., 1995) y porcina (Rybar y col., 2004). Valores por debajo de un 15-20% de fragmentación del ADN espermático, no experimentarían retrocesos apreciables en la fertilidad en bovino y porcino (Rybar y col., 2004). En semen fresco de verraco, Ardon y col., (2008) concluyeron que la probabilidad de que el espermatozoide con cromatina inestable alcance el huevo y lo fertilice, es baja y para los équidos, la integridad de la cromatina junto con las anomalías del espermatozoide serían los parámetros más útiles a la hora de predecir la capacidad fecundante (Morrel y col., 2008). Por otra parte, experimentos realizados por fecundación *in vitro* (FIV) utilizando espermatozoides de toro con daño severo en su ADN provocado por radiaciones gamma (10 Gy) demostraron que el espermatozoide permanecía intacto funcionalmente a nivel de membrana, de organelas y de movilidad (Fatehi y col., 2005), presentaban normalidad en la unión a la zona pelúcida del ovocito durante la fecundación y las tasas de oocitos fertilizados, permanecieron normales. Sin embargo, los embriones obtenidos murieron por apoptosis durante la etapa de 4 a 8 células, posiblemente debido a una expresión defectuosa del genoma (Bordignon y Smith, 1999; Ahmadi y Ng., 1999; Fatehi y col., 2005; Silva y Gadella, 2006).

8.1.- Evaluación de la fragmentación del ADN.

El estudio de este parámetro se puede realizar mediante el empleo de diferentes técnicas que permiten detectar la presencia de lesiones en el ADN.

Inicialmente, se utilizaron pruebas con colorantes fluorescentes que actualmente son poco utilizadas, o bien en algunos casos, controvertidas y son las siguientes:

- Naranja de Acridina (AO), es un fluorocromo que distingue entre roturas simples y dobles de los ácidos nucleicos (Tejada y col., 1984; Khalifa y col., 2008).
- Azul de Toluidina (AT), señala la persistencia de las histonas (Mello, 1982; Belletti y Mello, 2004; Nava-Trujillo y col., 2013).
- Cromomicina A3 (CMA), señala la deficiencia de protaminas (Bianchi y col., 1993).

Actualmente las técnicas más innovadoras se basan en dos estrategias diferentes para estudiar la fragmentación del ADN espermático:

La primera estrategia incluye las metodologías que implican el marcaje de roturas de cadena sencilla y de cadena doble de la molécula de ADN *in situ*, que se registran de forma natural o fortuita. Se utilizan procesos enzimáticos para la incorporación *in situ* de nucleótidos modificados sobre los espermatozoides fijados en un portaobjetos (Cortés-Gutiérrez y col., 2007). En este grupo se incluyen:

- TUNEL o Terminal dUTP Nick-End Labeling, por marcaje del extremo libre utilizando una transferasa terminal (Sun y col., 1997; Lopes y col., 1998; Fatehi y col., 2005; Waterhouse y col., 2006).
- *In Situ Nick Translation* (ISNT), por marcaje del extremo terminal 3-OH utilizando una ADN polimerasa (Gorczyca y col., 1993).

La segunda estrategia incluye aquellas técnicas que miden la capacidad de la cromatina y en particular del ADN, para desnaturalizarse frente a determinados tratamientos (Cortés-Gutiérrez y col., 2007). En este grupo se incluyen:

- Test de dispersión de la cromatina espermática (SCD: Sperm Chromatin Dispersión) (Fernández y col., 2003, 2007).
- Ensayo de Cometas. (Singh y col., 1988; Slowinska y col., 2008; Enciso y col., 2009, 2011b)

- Ensayo de estructura de la cromatina (SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay) (Evenson y col., 1980; Ballachey y col., 1987).
- Test de detección de la rotura del ADN mediante hibridación fluorescente *in situ*. (DBD-FISH: DNA Breakage Detection-Fluorescence In Situ Hybridization) (Fernández y col., 2000, 2002).

8.2.- Metodologías para la detección del daño en el ADN espermático.

8.2.1.- Test de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD: Sperm Chromatin Dispersión).

El Test de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD) (Fernández y col., 2003; Gosálvez y col., 2006; Fernández y col., 2007) está basado en la respuesta diferencial de la fragmentación o no, del núcleo del espermatozoide a un tratamiento de desproteinización mediante una solución de lisis específica (Figura 19). Una vez extraídas las proteínas, los espermatozoides con el ADN fragmentado muestran grandes halos alrededor del núcleo del espermatozoide.

Se ha ensayado con éxito para la determinación de la fragmentación del ADN en humana (Fernández y col., 2003) y en otras especies como:

- Verraco (Pérez-Llano y col., 2010).
- Toro (Gosálvez, y col., 2007, 2008, 2011c, Martínez-Pastor y col., 2009)
- Tenca “Tınca Tınca” (López-Fernández y col., 2009)
- Carnero (López-Fernández y col. 2008a).
- Macho cabrío (López-Fernández y col., 2009).
- Caballo (López-Fernández y col., 2007, Cortés-Gutiérrez y col., 2014).
- Burro (Cortes-Gutiérrez y col., 2008, 2014).
- Pollo (Shanmugam y col., 2014).
- Conejo (López-Fernández y Gosálvez, 2011).

- Especies salvajes: Koala (Jonhston y col., 2007, 2012), elefante (Imrat y col., 2012), llama, (Carretero y col., 2012).

La técnica, es versátil, está comercializada en kit y los resultados pueden ser interpretados mediante microscopía de fluorescencia o de campo claro, valorando el tamaño de los halos de dispersión de la cromatina. Sólo requiere que los espermatozoides se incluyan en microgeles de agarosa y sean sometidos a una solución de lisis apropiada (Fernández y col., 2005; Gosálvez y col., 2006).

La principal ventaja de esta técnica es la simpleza en su ejecución, y no requiere un equipo complejo, ni personal especializado en la interpretación de los resultados. La comparación de los resultados obtenidos del test SCD, muestran una correlación positiva con otras metodologías, tales como el SCSA o el TUNEL (Fernández y col., 2005; Chohan y col., 2006).

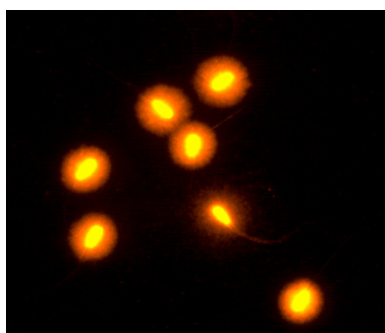


Figura 23. Espermatozoides de la raza de Lidia, sometidos al test SCD observados por microscopía de fluorescencia. La flecha indica un espermatozoide con el ADN del núcleo fragmentado.

8.2.2.- Ensayo de Cometas.

Otra técnica utilizada en el análisis del ADN del espermatozoide, es el ensayo de Cometas, también conocido como electroforesis de células únicas. Fue introducido por primera vez por Ostling y Johanson en 1984. Se basa en la capacidad de movilización de los fragmentos de un núcleo desproteinizado con roturas en sus cadenas de ADN hacia el polo positivo, cuando al descondensarse en el seno de un gel, es sometido a la acción de un campo eléctrico (Aravindan y col., 1997). La presencia de daño en el ADN se cuantifica midiendo la longitud de la cola, de forma

que el ADN íntegro, no genera o produce imágenes discretas de colas de cometa, mientras que aquellos núcleos que contienen el ADN con roturas, los fragmentos se desplazarán generando una imagen similar a la de un cometa (Singh y col., 1988; Cortés-Gutiérrez y col., 2007). A su vez, también se pueden utilizar otros parámetros de medida, tales como el “momento cola” que es el producto de la longitud de la cola por su intensidad (fracción del total del ADN de la cola) (Hellman y col., 1995).

También, se ha descrito el ensayo cometa de dos dimensiones que tras una electroforesis neutral y horizontal, distingue las roturas de cadena doble en el ADN espermático; en una segunda electroforesis alcalina detecta la fragmentación de cadena simple, ya que cada una de ellas, juega un papel en la fecundación, mientras que la fragmentación simple puede ser reparada por el ovocito, la de cadena doble no es reparable (Enciso y col., 2009, 2011b).

La metodología básica consiste en incluir una muestra de espermatozoides en un microgel de agarosa sobre un portaobjetos y someterlo a una solución de lisis que contenga un agente reductor de los grupos sulfidrilo que se encuentran en las protaminas del espermatozoide, como por ejemplo DTT (ditiotreitól). Tras la electroforesis, el microgel se tiñe con sustancias fluorescentes del tipo DAPI (4, 6 diamidino-2-fenilindol), YP (yoduro de propidio) o SYBR® Green.

También se ha descrito que puede predecir el porcentaje de desarrollo embrionario tras la FIV o la ICSI (Inyección Intracitoplasmática de espermatozoides), especialmente en parejas con esterilidad por causa desconocida (Morris y col., 2002). El ensayo cometa fue adaptado de forma sencilla para análisis de semen de otras especies ganaderas de mamíferos, como el verraco, el toro y el pollo (Fraser y Strzeżek 2004; Slowinska y col., 2008; Pérez-Llano y col., 2010; Enciso, y col., 2011b; Gosálvez y col., 2011b; Gliozzi y col., 2011).

El mayor inconveniente de este ensayo es que requiere un material de uso no común en un laboratorio de andrología, como son las fuentes de electroforesis para el ADN, y para la interpretación de los resultados se requiere un observador con experiencia o bien un software específico para que la prueba tenga cierta objetividad.

8.2.3.- Ensayo de estructura de la cromatina (SCSA: Sperm Chromatin Structure Assay).

El ensayo de la estructura de la cromatina (SCSA) fue desarrollado por el Dr. Evenson y col., (1980). Este método evalúa la resistencia de la cromatina espermática, a la desnaturalización inducida *in situ*, tras aplicar un tratamiento con calor o con una solución ácida (Evenson y col., 1980; Ballachey y col., 1988). La metodología se fundamenta en las características metacromáticas del fluorocromo Naranja de Acridina (AO) ($C_{17}H_{20}N_3Cl$) (Evenson y col., 2002) que se intercala entre las dos cadenas de ADN como un monómero. Al ser excitado, emite coloración verde (a 530 nm) si el ADN está intacto, o coloración roja a 640 nm si existen roturas de cadena sencilla (Macinnes y Uretz, 1966; Darzynkiewicz y col., 1975; Kosower y col., 1992). El grado de daño del ADN espermático se calcula de forma cuantitativa, al pasar las células por un citómetro de flujo (Erenpreiss y col., 2003). Éste nos va a proporcionar el valor de la fluorescencia de cada célula y el IF de la muestra que se expresa como IF (Índice de fragmentación del ADN espermático). Finalmente los resultados serán representados en un histograma (Darzynkiewicz y col., 1975; Evenson y col., 1980; Evenson, 1989; Evenson y col., 1994; Evenson y Tritle 2004).

A la hora de establecer correlaciones entre la fragmentación del ADN y la fertilidad del individuo, el SCSA es la técnica más aceptada hasta el momento. Principalmente se ha utilizado en muestras de espermatozoides humanos (Evenson y col., 1999) y en numerosas especies como el ratón (Evenson y col., 1980), la oveja (Peris y col., 2004), el toro (Ballachey y col., 1988, Karabinus y col., 1990), el macho cabrío (Martínez-Pastor y col., 2004), el verraco (Evenson y col., 1994), el caballo (Love y Kennedy, 1998), el perro (Núñez-Martínez y col., 2005; Prinosilova y col., 2012) y en animales salvajes como el ciervo, la cabra y el oso pardo (García-Macías y col., 2006a, 2006b; Fernández-Santos y col., 2007).

En la especie bovina se ha intentado relacionar los resultados de esta técnica con la fertilidad del toro desde hace más de 20 años (Ballachey y col., 1987). Estudios sucesivos han confirmado que existe relación del SCSA, con la fertilidad y otras características físicas y morfológicas de los espermatozoides de toro llegando a la conclusión de que valores en una muestra de $IF \geq 20\%$ indican una fertilidad baja

(Evenson, 1999; Bochenek y col., 2001; Ostermeier y col., 2001; Januskauskas y col., 2003; Rybar y col., 2004; García-Macías y col., 2006a; Kasimanickam y col., 2006; Waterhouse y col., 2006). El inconveniente que tiene esta tecnología es la inaccesibilidad para la mayoría de los laboratorios, por fundamentarse en el uso de la citometría de flujo, de coste muy elevado y dificultad en el manejo.

8.2.4.- Ensayo de marcado del extremo libre por dUTP (TUNEL: Terminal dUTP Nick End Labeling)

El ensayo TUNEL permite visualizar la incorporación de nucleótidos marcados en los extremos de las roturas existentes en el ADN, bien sean de cadena simple o doble. La reacción se cataliza *in situ*, mediante la acción de una transferasa terminal (TdT). Esta enzima incorpora la base deoxiuridina trifosfato (dUTP) en roturas de cadenas dobles o simples del ADN., concretamente dUTPs modificados con biotina o digoxigenina, en el extremo 3'-OH de la cadena afectada.

Posteriormente, los nucleótidos modificados pueden ser detectados tras una reacción con un anticuerpo conjugado con un fluorocromo a través de técnicas fluorescentes.

Los espermatozoides con ADN normal se tiñen con una fluorescencia de fondo, y aquellos que presentan ADN fragmentado (múltiples 3'-OH terminales) con una fluorescencia intensa (Gorczyca y col., 1993). Por tanto, cuantas más roturas tenga el ADN de cada espermatozoide, mayor intensidad tendrá la señal (Lopes y col., 1998; Chohan y col., 2006).

La técnica ha tenido una buena aceptación dado que es versátil, esta comercializada en kit y los resultados pueden ser interpretados mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Pero su mayor inconveniente es que el material que se utiliza viene precedido por un proceso de fijación de la cromatina que puede dificultar el acceso de las enzimas y la propia actividad enzimática puede ser irregular. Requiere un equipo sofisticado para su análisis y personal especializado.

8.2.5.- Prueba de ISNT (*IN SITU* NICK TRANSLATION).

La ISNT (Rigby y col., 1977) es una técnica que se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa, se detectan los cortes puntuales en la molécula de ADN

(“nicks”) y la enzima repara estos cortes, pero no solo introduce un nucleótido en el punto donde hubo el daño, sino que continúa recorriendo el corte a lo largo de la molécula e introduciendo nucleótidos hasta que se encuentra una señal de término. La metodología es similar al TUNEL, por incorporación de moléculas de dUTP modificado con biotina o digoxigenina, marcando directamente el ADN con un fluorocromo conjugado con un nucleótido modificado, tras utilizar la ADN polimerasa. La mayor diferencia con el TUNEL radica en que, en este caso, existe una actividad enzimática exonucleasa de la *pol I* y la incorporación de nucleótidos es mayor, por utilizar la cadena de ADN complementaria como molde.

Los resultados del análisis de ISNT se han utilizado para el estudio de la presencia de anomalías originadas durante la remodelación de la cromatina del espermatozoide (Gorczyca y col., 1993).

Desde el punto de vista práctico, esta técnica tendría las mismas prestaciones e inconvenientes que la de TUNEL, pero no está disponible de modo comercial para su aplicación directa sobre los espermatozoides.

8.2.6.- Test de detección de la rotura del ADN por hibridación fluorescente *in situ* (DBD-FISH: DNA Breakage Detection- Fluorescence in situ Hybridization).

El test de detección de la rotura del ADN mediante hibridación fluorescente *in situ* (DBD-FISH) se fundamenta en la capacidad que tienen ciertas soluciones alcalinas de producir una desnaturalización del ADN a partir de los extremos de roturas de doble cadena o de cadena sencilla, o bien lugares sensibles al álcali.

Después de la desnaturalización y extracción de las proteínas utilizando una solución de lisis, el ADN generado de cadena sencilla, puede hibridarse con una sonda de ADN. Cuantas más roturas existan en dicha cadena, mayor será el nivel de marcado que se obtenga en el núcleo (Fernández y col., 2000, 2002).

Al igual que las técnicas de TUNEL o ISNT, la técnica de DBD-FISH no se puede considerar de aplicación rutinaria por razones similares a las descritas previamente. Desde el punto de vista de la investigación, tiene mucho interés, ya que

Introducción

es la única técnica disponible que nos permite evaluar daño celular *in situ*, en secuencias específicas del ADN (Fernández y col., 2000).

OBJETIVOS

Objetivos

El objetivo principal de este trabajo de investigación es evaluar la calidad seminal de bovino, especialmente de la raza de Lidia, en el volumen, concentración, parámetros de movilidad, anomalías morfológicas y viabilidad, como parámetros clásicos y la fragmentación del ADN espermático como nuevo parámetro en el estudio de la calidad seminal.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1.- Establecer el índice de fragmentación basal del ADN espermático y su correlación con parámetros clásicos de calidad seminal en muestras seminales de la raza de Lidia y otras razas de vacuno extensivo.

2.- Comparar la influencia del método de extracción seminal utilizado (vagina artificial, electroeyaculación, *postmórtem*), la edad y la raza del semental sobre el índice de fragmentación del ADN espermático y el resto de parámetros clásicos de calidad seminal.

3.- Determinar la dinámica de fragmentación *in vitro* del ADN espermático de dosis seminales criopreservadas de la raza de Lidia y valorar el efecto de la temperatura, la variabilidad intra e interindividual y el método de extracción.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL.

1.1.- Reactivos.

1.1.1.- Procesado del material seminal.

- Triladyl® (Minitüb, Tiefembach, Germany).
- Bioxcell® (IMV, L'Aigle, Francia).
- Suero fisiológico (0,9 % NaCl).

1.1.2.- Test de Dispersión de la Cromatina Espermática

- Kit Sperm-Halomax® (Halotech S.L., Madrid, España).
- PBS.
- Acromax (Acromax®).
- Agarosa (Kit Sperm-Halomax®).
- Solución de lisis (Kit Sperm-Halomax®).
- Agua destilada.
- Etanol al 70%, 90% y absoluto. (MERK 1.00983.1000).
- Gel-Red (Biotium, Hayward, CA, USA).
- Vectashield (VectorLab, Burlingame).

1.1.3.- Test de viabilidad.

- Kit Duo-Vital® (Halotech S.L., Madrid, España).

1.1.4.- Ensayo Cometa neutro.

- NaOH.
- Buffer TBE 1X.
- Solución alcalina. NaOH 0,03 M.
- Solución neutra: Buffer 0,4 M Tris-hidroclorido (pH 7,5).
- H2O2.

1.2.- Plástico y vidrio.

- Puntas de pipetas automáticas: 1 ml, 100 µl y 10 µl.
- Pipetas Pasteur de plástico.

Material y métodos

- Porta objetos pretratados. (Kit Sperm-Halomax®).
- Porta objetos.
- Cubreobjetos de 18×18 y 22×22.
- Gradillas.
- Flotadores para tubos de 0,5 ml.
- Cajas de frío.
- Tubos tipo Eppendorf de 1,5 ml y 0,5 ml.
- Tubos Falcon de 50 ml.
- Cubetas.
- Cubetas desechables para espectrofotometría
- Conos de plástico.
- Tubo colector graduado desechable de 15 ml.
- Guantes de látex
- Guantes de exploración rectal.
- Contenedores estériles.
- Bolsas de plástico de autocierre.
- Jeringas de plástico de 20 ml.
- Aguja Vacuette.
- Placas de Petri estériles.
- Pajuelas de polivinilo de 0,25 y 0,5 ml. (IMV, L'Aigle, Francia).
- Recipiente desechable para el semen diluido. (IMV, L'Aigle, Francia).
- Vasos de plástico para pajuelas
- Vaso de precipitados o matraz de 1 l.
- Probetas y tapones de diferentes volúmenes.
- Frasco dosificador de suero fisiológico.

1.3.- Aparatos y equipamiento.

- Pipetas automáticas IMV.: 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl.
- Pipetas automáticas. Biohit Proline. 0,5-10 ml., 100-1000 ml., 20-200 ml., 1000-5000 ml.
- Campana de Absorción de Gases. (Flowlan, S.V.).

- Baño maría (Precistern).
- Timer.
- Frigorífico a 4°C
- Bandejas de metal.
- Fuente de electroforesis (Bio-Rad).
- Termómetro registrador de temperatura.
- Tijeras.
- Pinzas mosquito y rectas.
- Vagina artificial de bovino. Modelo Danés (IMV, L'Aigle, Francia).
- Camisa de látex dura para vagina de bovino. (IMV, L'Aigle, Francia).
- Electroeyaculador. (Pulsator IV y accesorios).
- Electroeyaculador. (Electrojac 5 y accesorios).
- Portaconos. (IMV, L'Aigle, Francia).
- Estufa de convección natural (P/Selecta).
- Mango de bisturí y hojillas del nº 10.
- Caja de transporte congelación. (Dometic MT8B. Electrolux).
- Microscopio Triocular (Nikon, E-50).
- Microscopio de contraste de fases (Nikon, Eclipse50i).
- Microscopio de fluorescencia (Leica Microsystems, Barcelona, Spain)
- Cámara de vídeo digital (Basler A302 fs).
- Programa Sperm Class Analyzer (ISAS®, Proiser R+D S.L., Valencia).
- Placa calefactora de microscopio. (Warm Stage Controller Lin Kan.)
- Placa calefactora de sobremesa. (Plactronic P/selecta.)
- Calienta tubos eppendorf. (Proiser R+D S.L.)
- Espectrofotómetro: Accucel TM. Dilución 1/25. (IMV, L'Aigle, Francia).
- Congelador programable (Micro-Digitcool. IMV, L'Aigle, Francia).
- Máquina envasadora y selladora de pajuelas (MR S1 Dual Mixta. IMV, L'Aigle, Francia).
- Aguja de llenado desechables (IMV, L'Aigle, Francia).
- Aguja de succión estériles (IMV, L'Aigle, Francia).

- Gomas de llenado desechables (IMV, L'Aigle, Francia).
- Máquina envasadora de pajuelas (Branson Model E- 150. Minitube).
- Bomba de vacío (Minitube).
- Sellador de pajuelas por ultrasonidos (Fillip Mp 133. Minitube).
- Máquina impresora de pajuelas EasyCoder printer 2.0. (Minitube)
- Ordenador conectado a la máquina impresora. Software EasyCoder (Minitube).
- Identificador de pajuelas. (Digit-cool IMV, L'Aigle, Francia).
- Vitrina refrigerada horizontal. (MRS1 Dual. IMV, L'Aigle, Francia).
- Biocongelador Digitcool 5.300 CE. (IMV, L'Aigle, Francia).
- Rampas de colocación de pajuelas
- Equipo informático. 2704 Software 3T.
- Ranger para nitrógeno líquido, 210 l.
- Termo de nitrógeno (Cryofusión. Francia).

1.4.- Material biológico.

1.4.1.- Animales.

Se utilizaron muestras seminales procedentes de sementales sanos y elegidos al azar. La fertilidad de las dosis en estudio tras la inseminación artificial no está probada.

Se agruparon en función de la raza:

- Raza de Lidia: se analizaron 92 muestras seminales de 65 sementales de la raza de Lidia. La edad de los animales estuvo comprendida entre los 2 y los 15 años, procedentes de 30 ganaderías distribuidas por todo el territorio nacional, obtenidas entre los años 1995 y 2009 cedidas por el Instituto Español de Genética y Reproducción Animal (IEGRA) situado en Talavera de la Reina (Toledo).

- Raza Blanca Cacereña: se analizaron 40 muestras seminales de 34 sementales de la raza Blanca Cacereña. Las dosis se obtuvieron en el Centro de Selección y Reproducción Animal (CENSYRA) dependiente de la Junta de Extremadura (Badajoz). La edad de los individuos está comprendida entre los 2 y 8 años de edad,

obtenidas entre los años 1975 y 2009 cedidas por la Asociación Nacional de Ganado Vacuno de la Raza Blanca Cacerreña.

- Razas Especializadas: se analizaron 18 dosis seminales congeladas de 18 sementales de razas de producción cárnica y lechera (Limousin, Charolais y Holstein-Friesian) adquiridas a la empresa a M.G.A. S.L. de Benavente (Zamora).

Los animales del estudio no presentaron síntomas o lesiones de enfermedad, estaban desparasitados, bien alimentados y con buena conformación siendo sometidos a una analítica completa dando resultado negativo a las enfermedades de declaración obligatoria (Brucelosis, Tuberculosis, Leucosis enzoótica bovina y Lengua Azul) y otras enfermedades de tipo vírico y bacteriano como la Rinotraqueitis infecciosa bovina, Diarrea vírica bovina y tras un raspado prepucial, negativos a Trichomoniasis y Campylobacteriosis. En el caso concreto del CENSYRA los animales cumplieron la legislación vigente (Dir. 88/407/CEE y concordante) que incluye el diagnóstico de las enfermedades citadas y la Estomatitis Vesicular y Leptospirosis.

No se obtuvo toda la información sobre los parámetros seminales descritos en todas las dosis, por problemas en el momento del análisis, o por falta de información.

2.- MÉTODOS

2.1.- Colecta de material seminal

Antes de realizar la colecta se procedió a la limpieza y desinfección del material necesario así como a la zona prepucial para evitar al máximo la contaminación de la muestra.

2.1.1.- Electroeyaculación.

La colecta del material seminal por electroeyaculación se realizó en las ganaderías de origen a los toros de la raza de Lidia y en las instalaciones del CENSYRA de Badajoz a los sementales de la raza Blanca Cacerreña.

Preparación de la muestra

- En las ganaderías de lidia, se introdujo al semental en el muelco de contención. Se sujetó al toro por la cabeza, con un “sistema de tijera” a modo de

cepo y se accedió al animal por la apertura de puertas laterales habilitadas al efecto. En el CENSYRA de Badajoz se inmovilizó al animal en una manga de manejo, con una barra de contención por la parte trasera.

- Se preparó el electroeyaculador y se metió un cono de plástico con el tubo colector graduado, en el portaconos. Para evitar el cambio de temperatura del eyaculado, se sumerge el colector en una bolsa de plástico con agua caliente a 35 °C - 38 °C unida al portaconos.

Protocolo

- Se procedió al vaciado de la ampolla rectal y se realizó una palpación y posterior masaje rectal de la próstata, vesículas seminales y ampollas de Henle.

- Se introdujo el electroeyaculador en el recto con los electrodos en posición ventral, previa lubricación con vaselina esterilizada y a continuación se comenzó la estimulación con descargas de intensidad ascendente (desde 0 V hasta 15 V) de 2 V cada 2 s y paradas de 2 s de duración. No se estableció un ciclo específico porque depende de la respuesta individual de cada animal.

- Una vez que se produce la erección y protusión del pene, se acercó con cuidado el portaconos evitando recoger los fluidos presemiales.

- Tras la eyaculación, se cesó la estimulación eléctrica y se esperó unos segundos para recoger todo el contenido seminal. A continuación, se cogió el colector con el eyaculado e inmediatamente fue transportado al laboratorio para realizar el análisis seminal. En el caso de los sementales de la raza Blanca Cacereña, en las instalaciones del CENSYRA y en el caso de los sementales de Lidia, se realizó un primer análisis en la propia ganadería, en un laboratorio portátil y se comenzó con el procesado de la muestra durante el traslado en coche (1 h-5 h) al IEGRA.

Lectura de resultados.

Se realizó el análisis seminal subjetivo en las muestras de toros de lidia según establece el apartado 2.4. Y el análisis seminal informatizado con el software ISAS® a los toros de la raza Blanca Cacereña según establece el apartado 2.4.5.

2.1.2.- Vagina artificial.

Se realizó la extracción por vagina artificial a los toros de la raza Blanca Cacerña en las instalaciones del CENSYRA. Los animales han sido adiestrados a fin de que adquieran el hábito de saltar, respetando las normas sobre bienestar animal y seguridad laboral. Para cada animal se empleó una vagina artificial diferente, respetando normas sanitarias básicas para evitar la diseminación de enfermedades infecciosas.

Preparación de la muestra

- Se preparó la vagina colocando la camisa de látex dentro del cilindro y se colocó el cono colector fijándose con ligaduras.

- Se llenó la vagina con agua caliente a 65 °C para lograr una temperatura interna de 37 °C. El agua se introduce primero con la vagina en posición horizontal hasta que rebasa y luego en forma vertical desalojando el excedente. De esta manera, la presión intravaginal será la correcta en el momento de la introducción del pene en la vagina.

- Una vez colocado el tubo colector, se lubricó la entrada de la vagina artificial con vaselina esterilizada.

Protocolo

- Se usaron hembras sanas y de temperamento tranquilo como estímulo sexual.

- Se retiró la cola de la hembra atándose a uno de los miembros posteriores y el operador se situó al lado derecho del animal. Con la mano derecha se sostuvo la vagina artificial y cuando el macho inició el salto, con la mano izquierda desvió la dirección del pene (tocando solamente el prepucio) hacia la vagina para introducirlo en ésta.

- Una vez que el macho comenzó a eyacular se dejó la vagina el tiempo suficiente para poder recolectar todo el material seminal.

- Una vez extraída la vagina, se cerró e identificó el tubo colector graduado con el eyaculado e inmediatamente fue trasladado al laboratorio mediante un

“montacargas” en un baño termostático a 37 °C hasta que se finalizó la prueba de valoración seminal.

Lectura de resultados

Se realizó el análisis seminal informatizado utilizando el software ISAS®, según establece el apartado 5.3.2.

2.1.3.- Recogida *postmórtem* por flujo retrógrado.

Se recolectaron los testículos de toros que han sido lidiados en plazas de toros de todo el territorio nacional. Los testículos fueron procesados en el IEGRA.

Preparación de la muestra.

- Recolección de las bolsas escrotales entre 10 y 20 min después de la muerte del toro.

- Cada bolsa escrotal se colocó dentro de bolsas plásticas selladas e identificadas y éstas a su vez se colocaron en una nevera portátil a una temperatura de 5 °C.

- El tiempo transcurrido desde la recolección de los testículos hasta el procesamiento de cada uno de ellos en el laboratorio varió entre 1 h y 5 h.

Protocolo.

Los espermatozoides epididimarios se recolectaron según el protocolo indicado por el IEGRA.

- Para la recuperación de los espermatozoides, de cada testículo se diseccionó la cola del epidídimo y el conducto deferente; se retiró la túnica vaginal y los vasos sanguíneos con bisturí y tijera recta.

- Se localizó la zona media de la cola del epidídimo y se realizó un corte transversal en el lugar anterior al comienzo de la disminución del diámetro epididimal, para obtener la mayor cantidad de espermatozoides posibles.

- Se situó la cola del epidídimo en una placa de Petri y se introdujo una aguja de calibre 22 con punta “roma” y una jeringa de 20 ml con aproximadamente 10 ml del diluyente Triladyl® en el lumen del conducto deferente y se perfundió

lentamente. Las paredes del conducto deferente se pinzaron con una pinza "mosquito" contra la aguja para evitar la pérdida del líquido de lavado. A continuación, se obtuvo lentamente el líquido espermático epididimario por el extremo cortado de la cola del epidídimo.

Lectura de resultados.

- Se determinó el volumen recuperado del lavado de la cola del epidídimo mediante un colector graduado. El valor obtenido para el volumen seminal resultó de la conjunción de dos saltos sucesivos con un intervalo de 15 min.

- Se hizo la lectura de la movilidad espermática epididimaria pasados 40 min tras la recolección del fluido.

- Se realizó la valoración de semen de forma subjetiva según establece el apartado 5.3.1.

2.2.- Procesado y congelación de material seminal.

Una vez determinado los parámetros seminales de cada eyaculado, se mezcló el semen con el diluyente a 37 °C (Triladyl® en el caso del IEGRA y Andromed® en el caso del CENSYRA de Badajoz).

Protocolo.

- El semen fue diluido con el volumen de medio necesario para rellenar el número de dosis calculadas. Posteriormente se trasladaron al lugar de envasado a temperatura ambiente en un recipiente desechable.

- Se realizó el llenado, sellado e identificación de las pajuelas en el interior de una vitrina de refrigeración a una temperatura constante de 5 °C. El llenado de las pajuelas se hizo mecánicamente mediante succión y selladas por ultrasonidos. La identificación se realizó mediante una máquina conectada a un ordenador de sobremesa controlado por el Programa EasyCoder.

- Las pajuelas fueron colocadas en rampas aptas para la congelación, donde se cuentan y comprueban que están perfectamente llenas, selladas y marcadas.

- Las rampas con las dosis se colocaron en la cámara de refrigeración para que la temperatura descienda de los 24 °C a los 5 °C, a razón de 0,2 - 0,3 °C/min. El periodo de equilibrado del semen fue aproximadamente de 4 h.

- En el IEGRA la congelación se realizó con un congelador programable, siguiendo la curva estándar para congelación de semen bovino de (+ 4 °C a -10 °C a -5 °C/ min; de -10 °C a -100 °C a -40 °C/min, y de -100 °C hasta -140 °C a -20 °C/min).

- En el CENSYRA, las dosis se congelaron en vapores de nitrógeno líquido en un biocongelador. La temperatura de congelación a la que se llega suele ser de -120 °C, utilizada sobre la rampa siguiente: (+5 °C a -6 °C, 4 °C/min; de -6 °C a -25 °C a -50 °C/min; de -25 °C a -100 °C a -50 °C/min; y de -100 a -120 °C a -80 °C/min).

- Las dosis fueron sumergidas en nitrógeno líquido conservándose a -196 °C hasta su contrastación o evaluación definitiva.

2.3.- Descongelación de dosis seminales.

Se extrajeron las muestras del tanque de nitrógeno líquido y fueron colocadas en hielo durante su transporte al laboratorio para conseguir una descongelación progresiva.

Protocolo.

- Introducir la pajuela en el baño maría a 37 °C y mantener durante 45 s. si el volumen de la pajuela es de 0,5 ml. o durante 30 s. si el volumen de la pajuela es de 0,25 ml.

- Cortar los extremos y depositar el semen en un tubo eppendorf de 1,5 ml.

2.4.- Evaluación de parámetros espermáticos.

Se evaluaron los parámetros clásicos seminales: volumen (VOL) concentración (CC), fragmentación del ADN espermático (IF), movilidad masal (MM), individual (MI), progresiva (MP), calidad de movimiento (CM) y las anomalías morfológicas (AM). Y tras la descongelación de las pajuelas se analizó la movilidad individual (MID), progresiva (MPD), anomalías morfológicas (AMD), y la viabilidad (V) El

análisis subjetivo en fresco y congelado de los parámetros de movilidad y morfología, fueron realizados por una persona experimentada.

2.4.1.- Volumen.

Tras la obtención de los eyaculados de los toros, se evaluó el volumen por lectura directa en el tubo colector graduado de 15 ml.

2.4.2.- Concentración.

La concentración del eyaculado, no deberá ser menor de 500 millones de espermatozoides por ml.

- En una cubeta para espectofotometría se colocan 3,960 ml de suero fisiológico y 40 µl de semen, dilución de 1/100.

- Se homogeneiza la muestra y se coloca la cubeta con las caras transparentes en sentido del haz de luz.

- Se realiza la lectura de la absorbancia y mediante una recta de calibrado se determina la concentración, el volumen de diluyente que hay que añadir al semen para obtener la concentración deseada y el número de dosis obtenida.

En el CENSYRA el número de espermatozoides por dosis fue de media de 30 millones por ml y el volumen de las pajuelas de 0,25 ml y en el IEGRA el número de espermatozoides por dosis fue de media de 60 millones por ml y el volumen de cada pajuela fue 0,5 ml.

2.4.3.- Movilidad espermática.

Se colocó una gota de 5 µl de semen puro en un portaobjetos atemperado a 37 °C y se observó en el microscopio de contraste de fase con un objetivo de 10 X. Se puntuó la movilidad masal de 0 a 3, considerando 0, la ausencia de movimiento y 3, ondas con movimiento muy rápido y vigoroso.

Para conocer el porcentaje de espermatozoides móviles se diluyó 250 µl de semen en 750 µl de medio. Esta dilución se observó con el objetivo 10 X al microscopio de contraste de fases provisto de una pletina calentable a 37 °C. Se

considera apto a partir de una movilidad individual ≥ 60 % y se consideró bueno a partir de un 70 % de espermatozoides móviles.

La Calidad del movimiento se valoró de 0 a 5 de la siguiente forma subjetiva:

- 0: sin movimiento.
- 1: ligera ondulación o vibración de la cola, sin progresión.
- 2: progresión lenta, incluyendo detención y comienzo de movimiento.
- 3: movimiento progresivo continuo y moderada velocidad.
- 4: movimiento progresivo rápido.
- 5: movimiento progresivo rápido, siendo difícil seguir visualmente el movimiento de las células.

El semen se consideró apto para el almacenamiento cuando superó una vez descongelado el 40% de movilidad individual y una Calidad del movimiento de 3-4.

2.4.4.- Análisis con Sistema CASA del eyaculado bovino.

Para realizar este análisis se utilizó el sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis), marca ISAS® y todas las determinaciones se realizaron a 37 °C. Los programas diseñados para estos equipos incluyen una serie de parámetros descriptores del movimiento espermático que son comunes a todos los sistemas CASA (Boyers y col., 1989; Farrell y col., 1995).

- De la dilución realizada para el análisis subjetivo de MI, se tomó una alícuota de 5 µl que se depositó entre cubre y porta (Tuli y col., 1992).

- Posteriormente se colocó la preparación sobre la platina del microscopio a 37 °C y se procedió a la captura de las imágenes.

- La generación de imágenes se realizó a través de una cámara de vídeo digital con un ocular fotográfico interpuesto de 3,3 X conectado al microscopio de contraste de fases y objetivo de 100 X.

- El análisis se basó en la captura de 16 imágenes fotográficas consecutivas, tomadas a intervalos de 40 ms, de cada campo microscópico seleccionado.

Las imágenes se digitalizaron mediante el software ISAS® de Movilidad.

2.4.5.- Anomalías morfológicas.

El estudio de las anomalías espermáticas de cada eyaculado, se realizó por fijación con glutaraldehído al 2 % y observación al microscopio con un objetivo de 100 X clasificándose en normales y anormales.

2.4.6.- Análisis de la fragmentación del ADN espermático.

2.4.7.- Test de Dispersión de la Cromatina Espermática.

Se ha utilizado el Kit Sperm-Halomax® *Bos taurus*, (Halotech SL. Madrid. España) test que facilita la evaluación del IF.

Preparación del análisis.

- Encender los baños de agua a las temperaturas de 37 °C y 38,6 °C.
- Fundir la agarosa para realizar el microgel en un baño a 90 °C o en el microondas.
- Una vez fundida, mantener en el baño de agua a 37 °C.
- Rotular los eppendorf:
 - Identificación del toro.
 - Fecha y secuencia temporal.
 - Temperatura de mantenimiento. (22 °C y 38,6 °C).
 - Descongelación de la dosis seminal (Apartado 4).
- Observar al microscopio de contraste de fases con el objetivo de 40 X (Nikon) para conseguir la concentración espermática necesaria.
- Efectuar la dilución de la muestra en PBS o Acromax® hasta conseguir una CC de 1×10^6 c/ml.

Protocolo.

- Dividir el contenido del tubo al 50% en dos eppendorf de 0,5 ml, identificados.

- Introducir el eppendorf en el baño a 38,6 °C y mantener la secuencia de tiempo estimada.
- Conservar el otro eppendorf a temperatura ambiente (22 °C) durante la misma secuencia de tiempo.
- Tomar 20 µl de la dilución. Mezclar con 50 µl de agarosa líquida.
- Pipetear 10 µl de la mezcla y depositarlo en un porta pretratado (Kit Sperm-Halomax®) y cubrir con un cubreobjetos de 22 ×22 mm.
- Depositar el porta sobre una superficie metálica fría a 4 °C durante 5 min para generar un microgel de agarosa y espermatozoides.
- Quitar el cubre suavemente, evitando romper o rasgar el gel.
- Depositar la muestra en una bandeja dentro de la campana de gases. Añadir aproximadamente 10 ml de solución de lisis (Kit Sperm-Halomax®) durante 5 min.
- Lavar la muestra en agua destilada, durante 5 min.
- Deshidratar la muestra en una serie de alcoholes creciente durante 2 min cada uno. (70%, 90%, 100%)
- Colocar el porta sobre una superficie horizontal con aire seco sobre papel de filtro, durante 20 min.
- Teñir la muestra, depositando 4 ml de Gel Red en un cubre, que a continuación colocaremos sobre el minigel.
- Observar la muestra bajo el microscopio de fluorescencia.

Lectura de resultados.

Se realiza el conteo de 500 espermatozoides por muestra, diferenciando entre:

- Espermatozoides fragmentados: aquellos que presentan un halo alrededor de la cabeza del espermatozoide formada por la difusión periférica de fragmentos de cromatina.
- Espermatozoides no fragmentados: presentan pequeños halos de relajación de los bucles de ADN unidos al core central.

Una vez realizado el conteo se realizará el P: % espermatozoides _(basales) = (Valor obtenido \times 100)/500.

Este proceso se realizará hasta conseguir una fragmentación completa, en una secuencia de tiempo establecida para el análisis: momento de la descongelación o 0 h, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 192 h, 216 h, y 240 h.

2.4.8.- Ensayo Cometa neutro.

El ensayo Cometa neutro analiza la naturaleza del daño en la molécula del ADN, concretamente las roturas de cadena doble del ADN del núcleo del espermatozoide.

Preparación de la muestra.

La preparación del ensayo Cometa y la descongelación de la dosis se realizan del mismo modo que para el análisis de fragmentación del ADN de espermatozoides de toro con una variante en el último paso: Diluir la muestra hasta conseguir una CC de 1×10^5 c/ml.

Protocolo.

- Fundir la agarosa y mantener a 37° C en un baño durante 20 min.
- Mezclar las células con la alícuota de agarosa a 37° C a una proporción de 2:10 (v/v) y realizar el el microgel a 4 °C durante 5 min.
- Incubar la preparación una primera solución de lisis durante 30 min.
- Incubar la preparación en una segunda solución de lisis durante 30 min.
- Colocar la muestra en Tris-Borato-EDTA (TBE 1X) solución buffer (0,089 M Tris, 0,089 M ácido bórico y 0,002 M EDTA) durante 10 min.
- Someter el microgel a una electroforesis con TBE 1X durante 8 min a 20 V.
- Introducir la muestra en una solución de NaCl al 0,9%, durante 2 min.
- Inmersión del microgel en una solución neutra (0,4 M Tris-hidroclorido buffer (pH 7,5) durante 5 min.
- Volver a incluir al microgel en TBE 1X durante 2 min.

- Desecar la muestra en una sucesión de etanoles al 70%, 90% y 100% durante 2 min cada una.

- Transferir la muestra a una unidad de electroforesis horizontal con TBE 1X hasta un nivel de aproximadamente 2-3 mm sobre el microgel situado en posición horizontal, y tapar. Utilizar una corriente de 20 V continua durante 8 min.

- Extraer la muestra cuidadosamente e incluirla en una solución de NaCl al 0,9 % durante 2 min.

- Inmersión del microgel en una solución neutra durante 5 min.

- Sumergir en etanol a 70%, 90% y 100% sucesivamente durante 2 min y secar.

- Teñir la muestra con 4 µl de Gelred sobre el microgel.

Lectura de resultados.

Observar al microscopio de fluorescencia la presencia de espermatozoides con dispersión de fragmentos de ADN en forma de cola, lo que corrobora la existencia de fragmentación del núcleo de los espermatozoides. Los fragmentos de ADN migraron fuera del núcleo celular hacia el ánodo y formaron una cauda o cola debido a las roturas simples en la hebra de ADN y a los lugares álcali-lábiles (Speit y Hartmann, 1999) dando lugar a la apariencia de cometas uniformes en la muestra. La magnitud del daño se evaluó de acuerdo al número de células afectadas, la longitud de la cola y a la intensidad de la fluorescencia de los fragmentos (Dhawan, y col., 2009).

2.4.9.- Tinción de viabilidad espermática.

El análisis de la viabilidad espermática determina el número de espermatozoides vivos y muertos que presenta cada muestra. Para la realización de este análisis se ha utilizado el Kit comercial Duo-Vital® (Halotech S.L. Madrid. España)

Protocolo.

- Diluir la muestra de espermatozoides a una concentración final de 10-15 M por ml en PBS.

- Disponer 15 µl de la dilución obtenida en un portaobjetos limpio.
- Añadir 1 µl de fluorocromo verde y 1 µl de fluorocromo rojo (individualizados en el kit) sobre la muestra que se quiere estudiar, mezclar y colocar un cubreobjetos.

Lectura de resultados.

-Observar bajo el microscopio de fluorescencia. Efectuar el conteo de al menos 500 espermatozoides por muestra.

- Calcular el porcentaje: $\% \text{ espermatozoides}_{(\text{vivos...})} = (\text{Valor obtenido} \times 100)/500$.

Este proceso se realizará para cada muestra seminal tras la descongelación de la misma.

3.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis estadístico de los resultados una vez obtenidos los datos de los seminales y los parámetros espermáticos, se archivaron en las correspondientes tablas de Microsoft Office Excel® (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA).

El análisis estadístico consistió en el estudio de la correlación entre las variables espermáticas, determinando los diferentes coeficientes de correlación lineal de Pearson junto con los valores de significación correspondientes según el test de correlación, con el fin de comprobar si el grado de asociación lineal resultó estadísticamente significativo ($Rho, P < 0,05$).

Para determinar la normalidad de los datos se aplicó el análisis de varianza (ANOVA). Cuando reveló un efecto significativo ($P < 0,05$), los tratamientos fueron comparados utilizando, el test de Student-Newman-Keuls. Las diferencias entre las medias de los grupos fueron contrastadas con el paquete estadístico SPSS (v17.0 Windows, SPSS S.A., Chicago, IL, EEUU) para determinar que dichas diferencias entre grupos eran significativas ($P < 0,05$).

Los resultados en todos los casos se expresan como media con su respectiva desviación estándar (DS).

Material y métodos

Para analizar la comparación entre las dinámicas temporales que muestran la pérdida de calidad del ADN espermático, se utilizó el estimador no paramétrico, Kaplan-Meier de la función de supervivencia (SPSS, v 17.0 Windows, SPSS S.A., Chicago, IL, EEUU).

RESULTADOS

1.- CARACTERÍSTICAS DEL ADN ESPERMÁTICO BOVINO.

1.1.- Validación del Test SCD en bovino.

El análisis de la fragmentación del ADN espermático fue realizado con el Test SCD. Con este método, es fácil identificar los espermatozoides que están fragmentados de los que no lo están. Como se muestra en la Figura 24a, tras realizar el test, los espermatozoides que aparecen con un halo de cromatina compacto, corresponden a los que presentan su ADN intacto, mientras que aquellos que están fragmentados aparecen con un gran halo de dispersión de los fragmentos de ADN (Figura 24a).

Con el fin de validar la técnica que va a ser utilizada, analizamos una muestra seminal de un toro, con el Test SCD y el ensayo Cometa neutro.

El ensayo Cometa es otra de las técnicas utilizadas en el análisis de la fragmentación del ADN. Presenta una gran sensibilidad, pues los fragmentos producidos por las roturas que se originan en el ADN nuclear, van a ser forzados a salir de la célula al pasar la corriente eléctrica. Para la validación, utilizamos una dosis seminal criopreservada para aplicar ambos tests y los resultados obtenidos quedan recogidos en la Tabla 3. Como se puede apreciar, los niveles de fragmentación fueron prácticamente los mismos.

Tabla 3. Fragmentación del ADN espermático de una dosis seminal de toro de Lidia con dos técnicas de análisis: SCD y ensayo Cometa neutro.

Técnicas de análisis	% Índice de fragmentación
Test SCD	85
Ensayo Cometa neutro	87

La Figura 24b, muestra como se observa el espermatozoide tras el ensayo Cometa neutro. Se muestra un espermatozoide con su ADN fragmentado, lo que provoca la migración de los fragmentos de ADN de izquierda a derecha. La nube de puntos corresponde al conjunto de fragmentos que escapan de la cabeza del espermatozoide al realizar la electroforesis.

Este resultado corroboró que no hay diferencias en función de la técnica utilizada, lo cual determinó que la Técnica SCD permite conocer con exactitud el IF de una dosis seminal criopreservada de cualquier bovino.

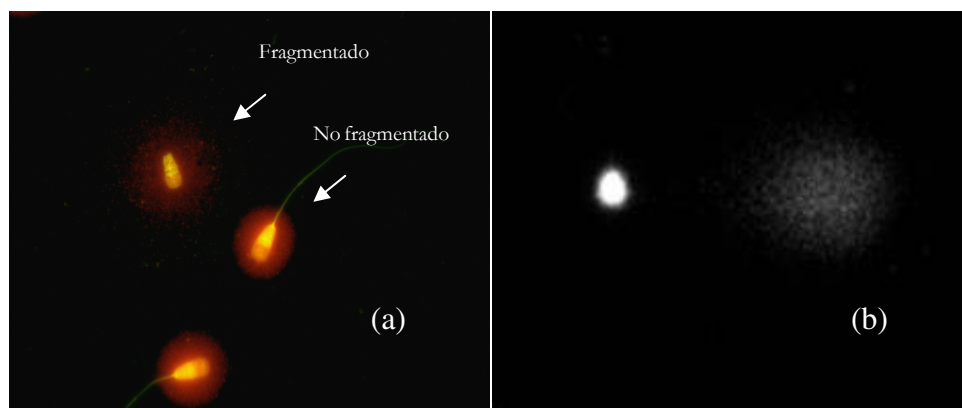


Figura 24. Espermatozoides fragmentados y sin fragmentar de toro analizados por la técnica de SCD (a) y por ensayo Cometa neutro (b).

1.2.- Índice de fragmentación basal del ADN espermático bovino.

Se evaluó el índice de fragmentación (IF) del ADN espermático de 150 dosis correspondientes a sementales de la especie bovina. La media obtenida fue de $8,08\% \pm 6,48\%$ (media \pm desviación estándar) con un rango de variación de 0,67%-36,33%. Ya que los índices de fragmentación muestran un rango muy amplio, se clasificaron las dosis en tres grupos en función del porcentaje de fragmentación que podría afectar a su potencial fertilidad (Tabla 4): IF inferior al 20%, entre el 20-30% y superior al 30%, apreciándose diferencias significativas ($P < 0,001$) entre los tres grupos.

Tabla 4. Grupos de fragmentación del ADN espermático bovino.

Grupos IF	N	Media \pm DS	Min.-Máx.
IF $\leq 20\%$	143	$6,97 \pm 4,00^a$	0,67-19,00
IF = 20-30%	2	$25,00 \pm 3,30^b$	22,67-27,33
IF $\geq 30\%$	5	$33,26 \pm 3,01^c$	30,00-36,33
Total	150	$8,08 \pm 6,48$	0,67-36,33

^{a, b, c} Superíndices distintos indican diferencias significativas (Student-Newman-Keuls, $P < 0,001$).

Al observar que 7 dosis seminales superaron el 20% de fragmentación, se realizó de nuevo otra clasificación en función de la raza de los sementales: Lidia, Blanca Cacerena y razas especializadas (Charolais, Limousin, Holstein-Friesian) y los

resultados indicaron que las 7 muestras pertenecieron a toros de la raza Blanca Cacerreña (Figura 25).

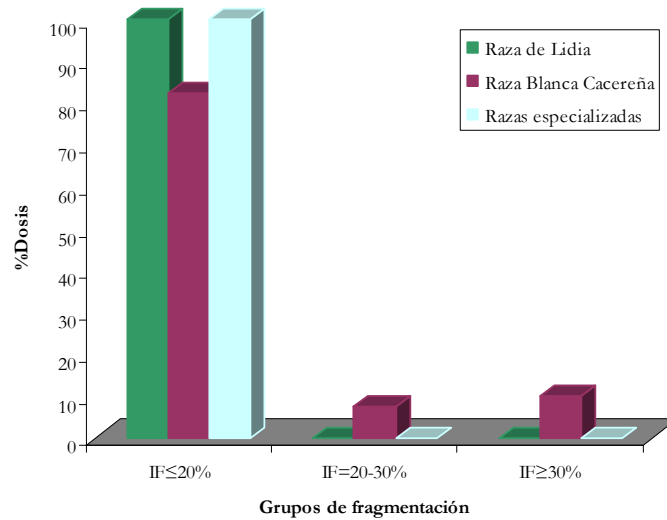


Figura 25. Grupos de fragmentación del ADN espermático bovino en función de la raza.

1.3.- Correlación entre el IF y otros parámetros de calidad seminal.

El análisis de calidad seminal de los eyaculados de la raza de Lidia (N=92) se realizó de forma subjetiva y los de la raza Blanca Cacerreña (N=40) con el sistema CASA. No se consideraron diferencias en los resultados en función del tipo de valoración, porque la evaluación subjetiva fue realizada por una persona con experiencia contrastada.

Tras el análisis estadístico, los resultados (Tabla 6) indicaron que el IF se correlacionó significativamente de forma positiva (Rho , $P < 0,05$) con la movilidad masal y de forma negativa con anomalías morfológicas y viabilidad postdescongelación.

Tabla 5. Correlaciones de los parámetros espermáticos analizados en fresco y tras la descongelación¹

	IF	VOL	CC	MM	MI	MP	CLM	AM	MID	MPD	AMD
VOL	0,101	-									
CC	-0,085	0,310(**)	-								
MM	0,211(*)	0,048	0,269(**)	-							
MI	-0,039	0,153	0,265(**)	0,464(**)	-						
MP	-0,176	0,088	0,341(**)	0,339(**)	0,672(**)	-					
CLM	0,028	-0,143	0,113	0,234	0,743(**)		-				
AM	0,287(**)	-0,116	0,295(**)	0,102	0,283(**)	0,398(**)		-			
MID	-0,160	0,113	0,038	0,292(**)	0,346(**)	0,335(**)	0,302	0,052	-		
MPD	-0,150	0,451(**)	0,090	0,342(**)	0,759(**)	0,631(**)		0,145	0,503(**)	-	
AMD	-0,101	0,094	0,093	0,091	0,149	0,433(**)		0,980(**)	0,149	0,166	-
V	0,602(**)	-0,098	0,261	-0,085	0,087	0,268		0,290	0,374(*)	0,206	0,247

La correlación Rho de Spearman es significativa *al nivel 0,05 (bilateral) ** al nivel 0,01 (bilateral).

¹Índice de fragmentación (IF%) volumen (VOL ml.), concentración ($\times 10^6$ / ml.) (CC) anomalías morfológicas (AM, %), movilidad progresiva (MP, %) movilidad individual (MI, %) movilidad masal (MM, 1 - 3) movilidad progresiva postdescongelación (MPD, %) movilidad individual postdescongelación (MID%) calidad de movimiento espermático (CLM, 0-5), anomalías morfológicas postdescongelación (AMD, %) y viabilidad postdescongelación (V, %).

El volumen del eyaculado, se correlacionó significativamente de forma negativa (Rho, $P < 0,01$) con concentración y de forma positiva con movilidad progresiva postdescongelación. La concentración se correlacionó significativamente de forma positiva (Rho, $P < 0,01$) con movilidad masal, individual, progresiva y anomalías morfológicas. Los parámetros de movilidad espermática se relacionaron entre sí de la siguiente forma: la movilidad masal se correlacionó significativamente de forma positiva (Rho, $P < 0,01$) con las movilidades individual y progresiva en fresco e individual y progresiva postdescongelación, la movilidad individual también se correlacionó significativamente de forma positiva (Rho, $P < 0,05$) con movilidad progresiva, calidad de movimiento, anomalías morfológicas y con las movilidades individual y progresiva postdescongelación, la movilidad progresiva se correlacionó significativamente de forma positiva (Rho, $P < 0,01$) con anomalías morfológicas. Y el parámetro de movilidad individual espermática, analizado tras la descongelación, se correlacionó significativamente de forma positiva (Rho, $P < 0,01$) con la movilidad progresiva postdescongelación y con la viabilidad postdescongelación (Rho, $P < 0,05$). Por último, la presencia de anomalías morfológicas en las dosis seminales se

correlacionaron significativamente de manera positiva (Rho , $P < 0,01$) con las anomalías morfológicas postdescongelación.

2.- FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN LA CALIDAD SEMINAL DE LAS RAZAS DE LIDIA Y BLANCA CACEREÑA.

2.1.- Influencia de la raza bovina.

Tras los resultados descritos en el apartado 1.2 se comprobó que existen diferencias significativas entre la raza bovina y el conjunto de parámetros seminales analizados.

Para el IF hubo diferencias significativas ($P < 0,001$) siendo superior en la raza Blanca Cacerena ($N=40$) con un $13,97\% \pm 9,03\%$ (media \pm desviación estándar) dentro del rango del $2,00\%-36,33\%$. En la raza de Lidia ($N=92$) se obtuvo un $6,05\% \pm 3,10\%$, con un rango del $0,67\%-14,33\%$, y para el grupo de tres razas especializadas ($N=18$) del $5,42\% \pm 4,20\%$ con un rango del $1,00\%-18,00\%$. También la raza tuvo efectos significativos ($P < 0,001$) en el volumen del eyaculado y las anomalías morfológicas postdescongelación. Los toros de las razas especializadas produjeron mayor volumen de semen (17ml. ; $N=4$) que los de la raza de Lidia ($8,37\text{ ml.}$; $N=82$) y los de la raza Blanca Cacerena ($8,89\text{ ml.}$; $N=40$). Con respecto a las anomalías morfológicas postdescongelación, destaca la raza Blanca Cacerena ($23,39\%$; $N=9$) sobre la raza de Lidia ($10,65\%$; $N=82$) y las razas especializadas ($9,00\%$; $N=4$).

El resto de parámetros espermáticos (movilidad masal, individual, progresiva, anomalías morfológicas en fresco, y movilidad individual y progresiva postdescongelación) no presentaron diferencias significativas entre razas ($P > 0,05$), mostrando poca variabilidad entre sementales (Tabla 5).

Tabla 6. Parámetros espermáticos¹ de eyaculados en fresco y postdescongelación de toros de la raza de Lidia, Blanca Cacereña y razas especializadas.

PARÁMETROS	Lidia	Blanca Cacereña	Razas especializadas
IF	6,05±3,10 ^a	13,97±9,03 ^b	5,42±4,20 ^a
VOL	8,37±3,97 ^a	8,89±3,83 ^a	17,00±2,94 ^b
CC	977,70± 368,33	941,96± 366,72	615,00± 199,08
MM	1,68±0,93		1,75±,50
MI	73,31±11,75	76,60±6,73	77,50±8,66
MP	68,41±11,36	-	70,00±8,17
CLM	-	3,74±0,39	-
AM	10,55±2,85	-	9,00±0,82
MID	34,17±11,49	37,13±7,50	32,50±15,55
MPD	64,69±16,39	-	57,50±32,02
AMD	10,65±3,07 ^a	23,39±7,72 ^b	9,00±0,82 ^a

Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias significativas, Student-Newman-Keuls^{a,b} P<0,001; ^{c,d} P<0,05. Los valores son media ± DS.

¹Índice de fragmentación (IF%), volumen (VOL ml.), concentración ($\times 10^6$ /ml.) (CC) anomalías morfológicas (AM, %), movilidad progresiva (MP, %) movilidad individual (MI, %) movilidad masal (MM, 1 - 3) movilidad progresiva postdescongelación (MPD, %) movilidad individual postdescongelación (MID%) calidad de movimiento espermático (CLM, 0-5), y anomalías morfológicas postdescongelación (AMD, %).

Tras el análisis del conjunto de parámetros seminales en función de la raza se observaron diferencias con respecto al volumen seminal, el IF y las anomalías morfológicas postdescongelación, destacando los toros de la raza Blanca Cacereña con los niveles más elevados en los dos últimos parámetros descritos.

2.2.- Influencia del método de extracción utilizado.

2.2.1.- Extracción seminal por vagina artificial frente a electroeyaculación en la raza Blanca Cacereña.

Al realizar la extracción seminal mediante vagina artificial y electroeyaculación al mismo toro (N=6), los resultados mostraron que los eyaculados obtenidos no presentaron diferencias significativas (P>0,05) con respecto al IF y el resto de parámetros espermáticos analizados: volumen, concentración, movilidad masal, movilidad individual en fresco y postdescongelación, movilidad individual, anomalías morfológicas y el movimiento de los espermatozoides (estáticos, lentos, medios y rápidos progresivos) (Tabla 7).

Tabla 7. Comparativa de los parámetros espermáticos¹ de eyaculados en fresco y postdescongelación analizados tras la extracción con vagina artificial y por electroeyaculación.

PARÁMETROS	Método de Extracción	
	Electroeyaculación	Vagina Artificial
IF	8,50±3,23	9,39±5,39
VOL	11,42±3,77	12,75±2,82
CC	561,67±193,81	692,75±290,07
MM	1,88±0,21	1,71±0,46
MI	76,67±4,08	73,00±5,09
MID	37,50±8,80	41,67±4,08
AMD	28,17±11,09	21,00±5,06
E	12,45±4,01	15,72±6,67
L	2,25±1,85	1,15±0,55
M	10,28±7,42	4,03±3,00
RP	73,30±5,94	75,25±6,59
AMD	28,17±11,09	21,00±5,06

¹Índice de fragmentación (IF, %) volumen (VOL, ml), concentración (CC, $\times 10^6$ /ml.) movilidad individual (MI,%), movilidad individual postdescongelación (MID,%), espermatozoides estáticos (E,%), lentos (L,%), medios (M,%) y rápidos progresivos (RP,%) anomalías morfológicas postdescongelación (AMD,%). Los valores son media \pm DS.

Los resultados obtenidos indican que el método de extracción utilizado (vagina artificial y electroeyaculación) no influye en la fragmentación del ADN espermático ni en el resto de parámetros de calidad seminal analizados.

2.2.2.- Influencia de la extracción seminal *postmórtem* en la raza de Lidia.

La extracción seminal por flujo retrógrado de la cola del epidídimo es un método de obtención espermática que únicamente se realiza en situaciones muy concretas, como es el caso del toro de Lidia que demuestra buenas características etológicas durante su lidia en la plaza. Para valorar el efecto de este método se analizaron las características seminales tras la extracción por electroeyaculación (N=74) y *postmórtem* (N=10) a diferentes toros de Lidia encontrándose diferencias significativas ($P<0,001$) para el IF, volumen seminal, concentración, movilidades masal, individual, progresiva y ($P<0,05$) progresiva postdescongelación y una tendencia positiva ($P<0,07$) con la viabilidad postdescongelación (Tabla 8).

Tabla 8. Comparativa de los parámetros espermáticos¹ de eyaculados en fresco y postdescongelación obtenidos por extracción postmórtem (N=10 en IF y en MI; N=9 en VOL, MM, MP, AM, MID, AMD; N=8 en CC; N=7 en MPD y V) y por electroeyaculación (N=74 en IF; N=58 en MP; N=35 en V; N=73 en VOL, CC, MM, MI, MID MPD AM, AMD).

PARÁMETROS	Método de Extracción	
	Postmórtem	Electroeyaculación
IF	2,90±1,506 ^a	6,46±2,963 ^b
VOL	4,00±4,637 ^a	14,05±6,902 ^b
CC	1385,88±732,691 ^a	932,97±279,299 ^b
MM	0,00±0,00 ^a	1,89±0,756 ^b
MI	60,50±24,994 ^a	75,07±7,288 ^b
MP	58,33±26,926 ^a	69,66±7,087 ^b
AM	11,33±5,339	10,45±2,421
MID	32,44±13,324 ^c	34,38±11,333 ^d
MPD	52,86±29,980 ^a	66,12±13,702 ^b
AMD	11,33±5,339	10,56±2,718
V	34,71±14,102	23,09±15,234

^{a,b} Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias significativas, Student-Newman-Keuls
^{a,b} P<0,001; ^{c,d} P<0,05. Los valores son media ± DS.

¹Índice de fragmentación (IF, %) volumen (VOL, ml.), concentración (CC, ×10⁶/ml.), movilidad masal (MM, 1-3), movilidad individual (MI, %), movilidad progresiva (MP, %), anomalías morfológicas (AM, %), movilidad individual postdescongelación (MID, %), movilidad progresiva postdescongelación (MPD, %) anomalías morfológicas postdescongelación (AMD, %) y viabilidad postdescongelación (V, %).

Al observar los datos obtenidos de los eyaculados extraídos *postmórtem*, los valores fueron más bajos para el IF (2,90% *vs.* 6,46 %), volumen (4,00 ml *vs.* 14,05 ml), movilidad masal (0,00 *vs.* 1,89), individual (60,50% *vs.* 75,07%), progresiva (58,33% *vs.* 69,66%) y también, movilidad progresiva postdescongelación (52,86% *vs.* 66,12%) y más elevados para la concentración espermática (1385,88 ×10⁶/ml *vs.* 932,97 ×10⁶/ml) y viabilidad postdescongelación (34,71% *vs.* 23,09%).

El resto de parámetros no presentaron significación (P>0,05).

De los resultados se desprende que los espermatozoides obtenidos directamente de la cola del epidídimo o *postmórtem* presentan mejores características espermáticas frente al IF, concentración y viabilidad postdescongelación, y peores frente al volumen y los parámetros de movilidad.

2.3.- Influencia de la edad.

2.3.1.- Raza de Lidia.

Con respecto a la edad de los toros de Lidia analizados se diferenciaron 3 grupos: jóvenes (≤ 3 años, N=9) adultos (>3 y ≤ 8 años, N=32) y viejos (>9 años, N=37).

Tabla 9. Comparativa de los parámetros espermáticos¹ en función de los grupos de edad en la raza de Lidia.

PARÁMETROS	Joven ≤ 3 años	Adulto >3 y ≤ 8 años	Viejo >9 años
IF	4,41 \pm 2,76 ^a	5,27 \pm 2,21 ^a	8,04 \pm 2,97 ^b
VOL	6,56 \pm 2,51 ^a	8,09 \pm 3,11 ^{ab}	10,34 \pm 3,64 ^b
CC	978,89 \pm 378,04	946,97 \pm 235,80	895,15 \pm 282,04
MM	2,11 \pm 0,72	1,83 \pm 0,89	1,88 \pm 0,64
MI	75,56 \pm 6,82	75,64 \pm 7,12	74,56 \pm 7,72
MP	72,78 \pm 9,05	69,83 \pm 6,75	68,68 \pm 6,89
AM	10,22 \pm 2,22	10,62 \pm 2,78	10,32 \pm 2,28
MID	40,56 \pm 11,02	36,21 \pm 12,30	31,76 \pm 9,53
MPD	72,50 \pm 8,22	65,91 \pm 13,06	66,21 \pm 13,67
AMD	10,22 \pm 2,22	10,76 \pm 2,76	10,44 \pm 2,88
V	33,92 \pm 24,44	23,51 \pm 14,03	21,74 \pm 15,52

^{a, b} Superíndices distintos en la misma fila indican diferencias significativas (Student-Newman-Keuls, $P<0,05$). Los valores son la media \pm DS.

¹Índice de fragmentación (IF%), volumen (VOL, ml.), concentración (CC, $\times 10^6$ / ml.), movilidad masal (MM, 0-3), movilidad individual (MI, %) movilidad progresiva (MP, %), anomalías morfológicas (AM, %), movilidad individual postdescongelación (MID, %) movilidad progresiva postdescongelación (MPD, %) anomalías morfológicas postdescongelación (AMD, %) y viabilidad postdescongelación (V, %)

Tras el análisis estadístico se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P<0,001$) para el IF y ($P<0,003$) para el volumen seminal. Los resultados indicaron que los toros jóvenes y adultos presentan un IF inferior a los toros viejos (4,41% y 5,27% *vs.* 8,04%). El volumen seminal también presentó diferencias pero en este caso entre los toros jóvenes y viejos (6,56 ml *vs.* 10,34 ml) sin diferencias entre jóvenes y adultos (Tabla 9). Con el resto de parámetros seminales analizados no hubo significación estadística ($P>0,05$).

Estos resultados indicarían que a partir de los 9 años de edad se produciría un aumento del IF y el volumen seminal.

2.3.2.- Raza Blanca Cacereña.

Los toros de la raza Blanca Cacereña se subdividieron en dos grupos de edad: jóvenes (≤ 3 años; $N=32$) y adultos (>3 y ≤ 8 años; $N=8$), no observándose diferencias estadísticamente significativas ($P>0,05$) en ningún parámetro espermático analizado (Tabla 10).

Tabla 10. Comparativa de los parámetros espermáticos¹ en función de los grupos de edad en la raza Blanca Cacereña.

PARÁMETROS	Joven ≤ 3 años	Adulto >3 y ≤ 8 años
IF	14,80 \pm 9,78	10,62 \pm 3,80
VOL	8,80 \pm 3,95	9,25 \pm 3,56
CC	946,95 \pm 381,19	921,96 \pm 324,34
CLM	3,77 \pm 0,37	3,63 \pm 0,48
MI	76,46 \pm 5,61	77,50 \pm 13,23
MID	37,97 \pm 7,92	33,75 \pm 4,43

¹Índice de fragmentación (IF, %) volumen (VOL, ml.), concentración (CC, $\times 10^6$ /ml, calidad del movimiento espermático (CLM, 0-5) movilidad individual (MI, %), movilidad individual postdescongelación (MID, %). Los valores son la media \pm DS.

Los resultados descritos muestran que hasta los 8 años de edad no existe influencia en los parámetros espermáticos analizados en los toros de esta raza.

3.- DINÁMICA DE LA FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO BOVINO

El estudio del IF basal de un eyaculado es un parámetro importante para ver los niveles de fragmentación de una muestra seminal. Pero también lo es conocer la integridad de la cromatina espermática con el paso del tiempo.

Para ello se analizó la dinámica de fragmentación del ADN espermático de muestras de ganado bovino cuando se incubaba a diferentes temperaturas (22 °C o T^a ambiente y a 38,6 °C o T^a corporal de la hembra). Realizar la dinámica de fragmentación en diferentes muestras seminales pertenecientes al mismo y a diferentes individuos nos permite conocer la posible variabilidad intra e inter-individual así como la influencia del método de extracción.

Resultados

Para analizar el efecto temporal en el IF, se definieron doce intervalos de tiempo: desde el momento de la descongelación o 0 h, hasta las 240 h. (0 h, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 192 h, 216 h y 240 h). Desde el punto de vista reproductivo no tiene mucho interés alcanzar las 240 h de incubación pues según Thomas, y col., (1998) los espermatozoides no sobreviven más de 72 h en el tracto reproductor de la hembra, sin embargo, conocer el número de horas que el espermatozoide de bovino necesita para alcanzar un índice de fragmentación del 100% es de suma importancia a la hora de comparar los diferentes eyaculados.

Para el análisis estadístico de supervivencia del ADN espermático solamente se utilizó la información extraída hasta las 96 h de incubación.

3.1.- Efecto de la temperatura sobre la dinámica de fragmentación del ADN espermático bovino.

Se incubaron *in vitro* 92 dosis de la raza de Lidia desde el momento de la descongelación hasta las 240h de incubación a dos temperaturas diferentes (22 °C y 38,6 °C) para conocer el límite temporal del eyaculado con una fragmentación del ADN completa o cercana al 100% (Tabla 11).

Tabla 11. *Dinámica de fragmentación del ADN espermático de la raza de Lidia a 38,6°C y 22°C durante 240h de incubación.*

T ^a	0 h	4 h	24 h	48 h	72 h	96 h
IF 38,6 °C	6,05±3,10	15,31±18,98	24,30±26,54	38,26±31,16	55,81±34,10	72,85±31,13
IF 22 °C	6,05±3,10	10,11±11,19	15,39±17,27	21,90±22,60	40,71±30,17	60,92±30,15
T ^a	120 h	144 h	168 h	192 h	216 h	240 h
IF 38,6 °C	79,47±29,66	84,06±28,83	87,64±26,97	92,46±21,68	96,28±15,40	97,31±13,90
IF 22 °C	71,10±28,74	77,57±27,07	81,92±26,75	88,02±23,07	90,59±20,81	93,52±17,39

Los valores son media ± DS.

Al realizar las medias de los porcentajes de fragmentación del ADN espermático se observó, que el IF se incrementó desde el inicio de la incubación *in vitro* a las dos temperaturas con un IF inicial del 6,05%±3,10% (media±desviación estándar) hasta el 97,31%±13,90% a 38,6 °C y hasta 93,52%±17,39% a 22 °C. También se observó en ambas temperaturas que tras 96 h de incubación los

espermatozoides presentaron una fragmentación del ADN superior al 50% (T^a 38,6 °C: $72,85\% \pm 31,13\%$; T^a 22 °C: $60,92\% \pm 30,15\%$).

Conocidas las dinámicas en función de la temperatura de incubación, se calculó la velocidad de degradación del ADN de los espermatozoides *in vitro*. El progreso de la fragmentación del ADN fue más rápido entre las 0 h-48 h de incubación a 38,6 °C mientras que a 22 °C la velocidad se incrementó súbitamente a partir de las 48 h-72 h. En ambos casos a partir de las 96 h de incubación la velocidad se ralentizó y, prácticamente, los resultados fueron similares entre las dos temperaturas hasta el final del estudio (Figura 26).

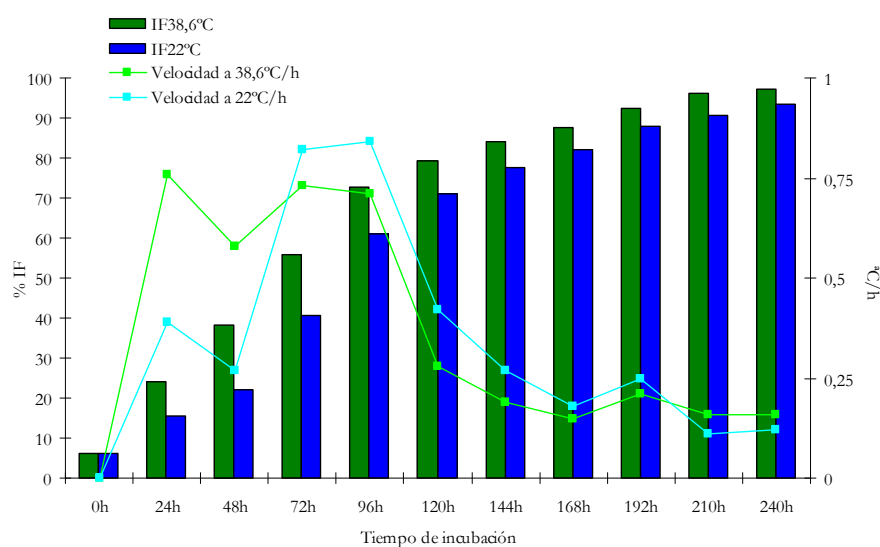


Figura 26. Velocidad de degradación del ADN espermático en función de la temperatura de incubación: $V = (IF \text{ a } T2 - IF \text{ a } T1) / \text{Tiempo de incubación}$.

Una vez determinada la velocidad de degradación del ADN, de las dosis incubadas, los resultados fueron analizados teniendo en cuenta la clasificación realizada por Rybar y col., (2004) que estableció que las dosis con un $IF \geq 20\%$ podrían presentar problemas de infertilidad (Figura 27).

A la temperatura del tracto genital de la hembra (38,6 °C) se observó que hasta las 48 h de incubación el 53,26% (N=49) de las dosis ya habrían alcanzado el valor de $IF \geq 20\%$.

Sin embargo, a temperatura ambiente (22 °C) la degradación mayoritaria del ADN espermático se produjo desde el inicio hasta las 72 h, con el 59,78% (N=55) de

Resultados

las dosis incubadas con un valor de $IF \geq 20\%$. Por tanto, podríamos considerar que las 48 h a 38,6 °C y las 72 h a 22 °C es el límite temporal de estabilidad del núcleo espermático en los toros de la raza de Lidia (Figura 27).

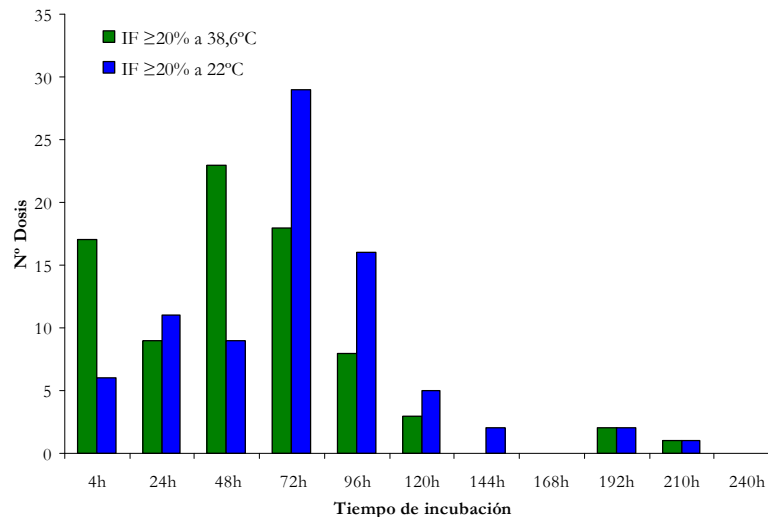


Figura 27. Número de dosis que alcanzan un $IF \geq 20\%$ en función del tiempo y la temperatura de incubación.

Se utilizó la función de supervivencia de Kaplan Meier para estudiar las diferencias en la velocidad de degradación espermática del ADN en función de la temperatura de incubación *in vitro* (Figura 29). Los resultados obtenidos indicaron la existencia de diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$), siendo la velocidad de degradación del ADN espermático más elevada a temperatura corporal de la hembra (38,6 °C).

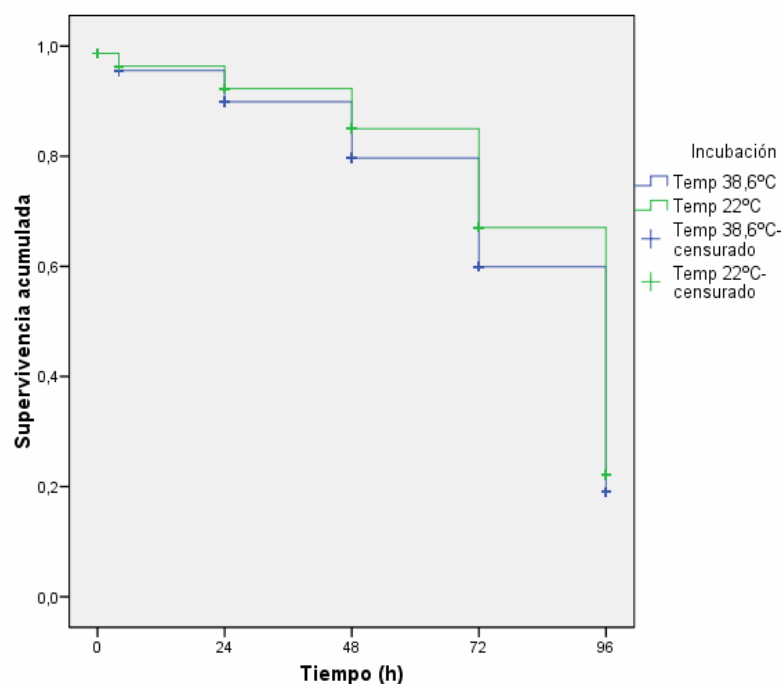


Figura 28. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático del toro de Lidia hasta las 96 h e incubación a 22 °C y 38,6 °C.

3.1.1.-Efecto de la extracción *postmórtem* sobre la dinámica de fragmentación del ADN en la raza de Lidia.

Los porcentajes medios de espermatozoides fragmentados detectados a las 0, 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h de incubación a 22 °C y 38,6 °C de 10 dosis seminales de toros de Lidia obtenidas *postmórtem* por flujo retrógrado de la cola del epidídimo se presentan en la Tabla 12.

Se observó que desde el momento de la descongelación de las dosis *in vitro* la fragmentación del ADN espermático aumentó progresivamente desde $2,90\% \pm 1,50\%$ (media \pm desviación estándar) hasta prácticamente degradarse por completo a 38,6 °C ($93,47\% \pm 6,54\%$). Sin embargo, a 22 °C la estabilidad de la cromatina fue mayor a 22 °C ($55,04\% \pm 22,46\%$).

Tabla 12. Dinámica de fragmentación *postmórtem* a 38,6°C y 22 °C hasta 96h de incubación.

T ^a	0h	4h	24h	48h	72h	96h
IF 38,6 °C	2,9 \pm 1,50	20,43 \pm 18,30	50,97 \pm 26,75	69,73 \pm 26,09	81,33 \pm 24,27	93,47 \pm 6,54
IF 22 °C	2,9 \pm 1,50	10,23 \pm 8,07	22,23 \pm 12,82	31,93 \pm 21,25	38,00 \pm 21,88	55,04 \pm 22,46

Los valores son media \pm DS

Resultados

A continuación, se utilizó la función de supervivencia de Kaplan Meier, para comparar la dinámica en la extracción postmórtem en función de la temperatura (Figura 30). El resultado indicó la existencia de diferencias significativas ($P < 0,001$), siendo más rápida a temperatura del tracto genital de la hembra (38,6 °C).

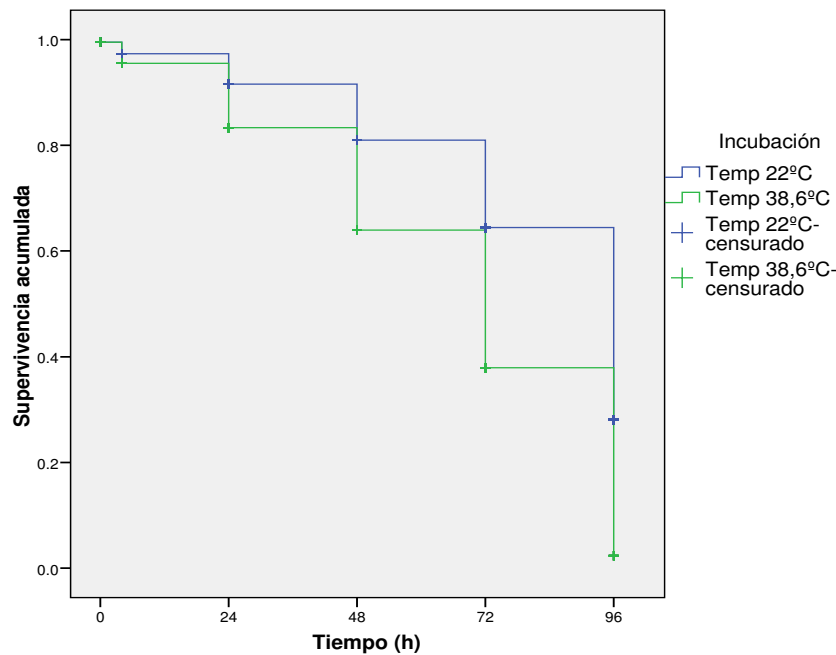


Figura 29. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático de la raza de Lidia por extracción postmórtem en función de la temperatura de incubación a 22 °C y 38,6 °C.

3.2.- Variabilidad individual en la dinámica de fragmentación del ADN espermático de la raza de Lidia.

Se ha observado variabilidad individual en los resultados en la dinámica del IF. Algunas dosis mostraron un incremento más rápido de la inestabilidad del ADN espermático alcanzando niveles muy elevados de fragmentación del ADN en tan sólo 4 h de incubación (N=7) y otras, por el contrario, fueron más estables en el tiempo al degradarse con posterioridad en diferentes momentos durante la incubación hasta las 240 h. Únicamente 2 dosis del mismo eyaculado de un toro, no se degradaron durante las 240 h de incubación a las dos temperaturas. Lo que es difícil de explicar.

Una vez observada esta variabilidad inter-individual se compararon las dinámicas de dosis seminales de eyaculados distintos extraídas al mismo toro en

épocas diferentes y por otra parte dosis pertenecientes al mismo eyaculado, para observar o no si existe variabilidad intra-individual.

3.2.1.- Estudio comparativo en dosis seminales procedentes del mismo eyaculado.

Se han analizado las dinámicas de fragmentación del ADN espermático durante 96 h de incubación *in vitro* a 38,6 °C de 2 dosis criopreservadas obtenidas del mismo eyaculado en 5 toros de la raza de Lidia.

Tras el análisis se observó que no hubo diferencias significativas ($P>0,05$) en los toros nº 1, 2, 3 y 5 (Figuras 31, 32, 35, 36) pero sí en las dosis del toro nº 4 ($P<0,001$) (Figura 34). Para verificar este resultado, se realizó el mismo análisis al toro nº 4 pero a temperatura ambiente (22 °C) no encontrándose diferencias ($P>0,05$) lo que indica que pudo deberse a una falta de celo en el procesado de la muestra a 38,6 °C (Figura 35).

El conjunto de los resultados indica que tras la incubación *in vitro* de los espermatozoides, la dinámica del IF fue la misma en las dosis obtenidas de un mismo eyaculado.

Resultados

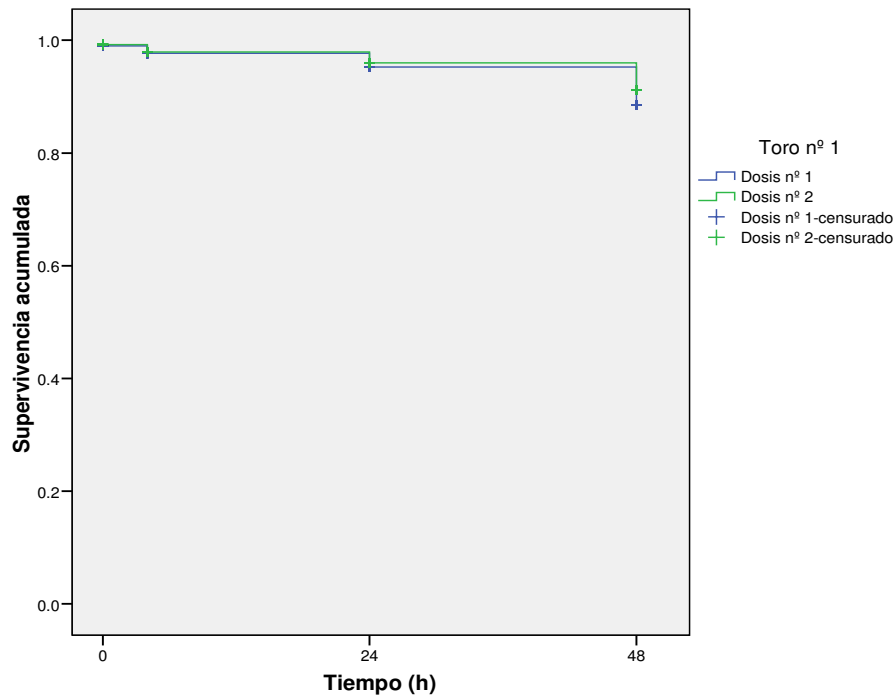


Figura 30. Dinámica de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas del mismo eyaculado del toro nº 1.

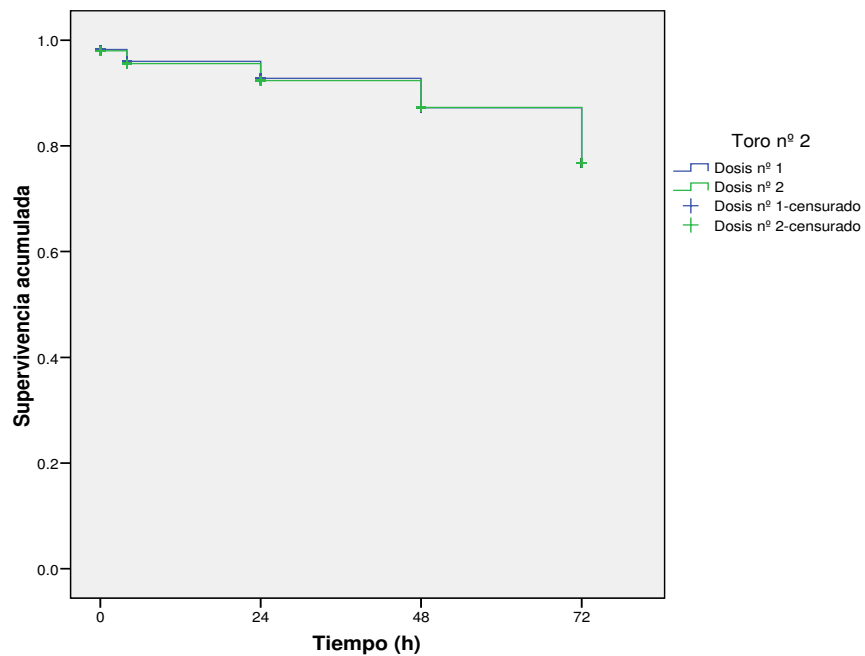


Figura 31. Dinámica de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas del mismo eyaculado del toro nº 2.

Resultados

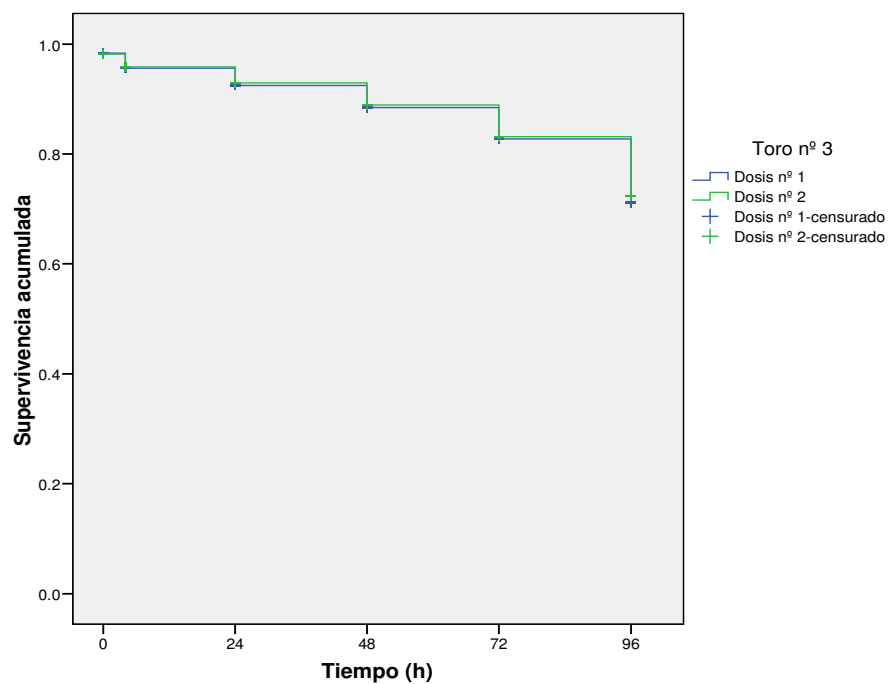


Figura. 32. Dinámica de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas del mismo eyaculado del toro nº 3

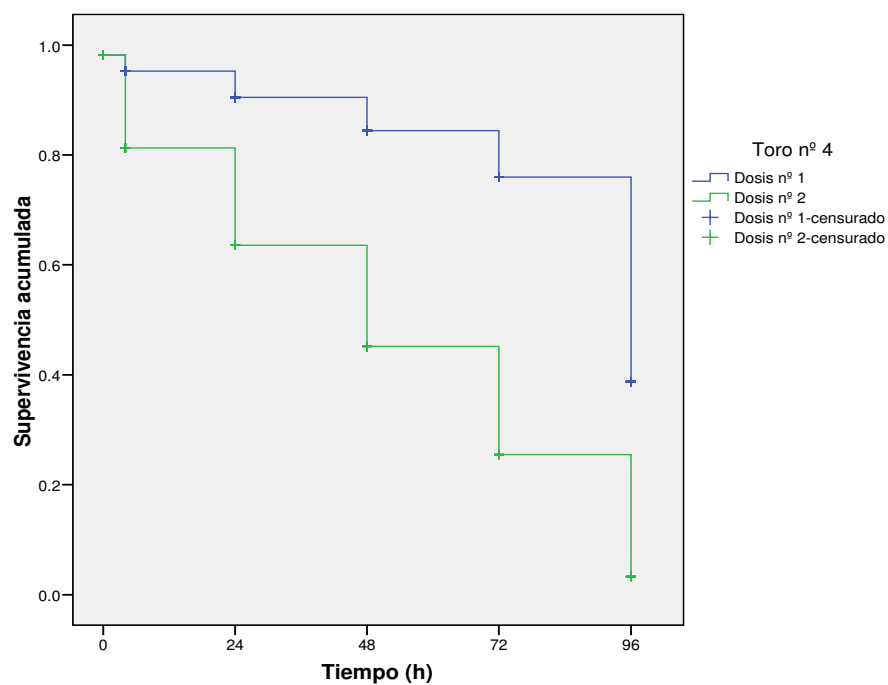


Figura 33. Dinámica de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas del mismo eyaculado del toro nº 4.

Resultados

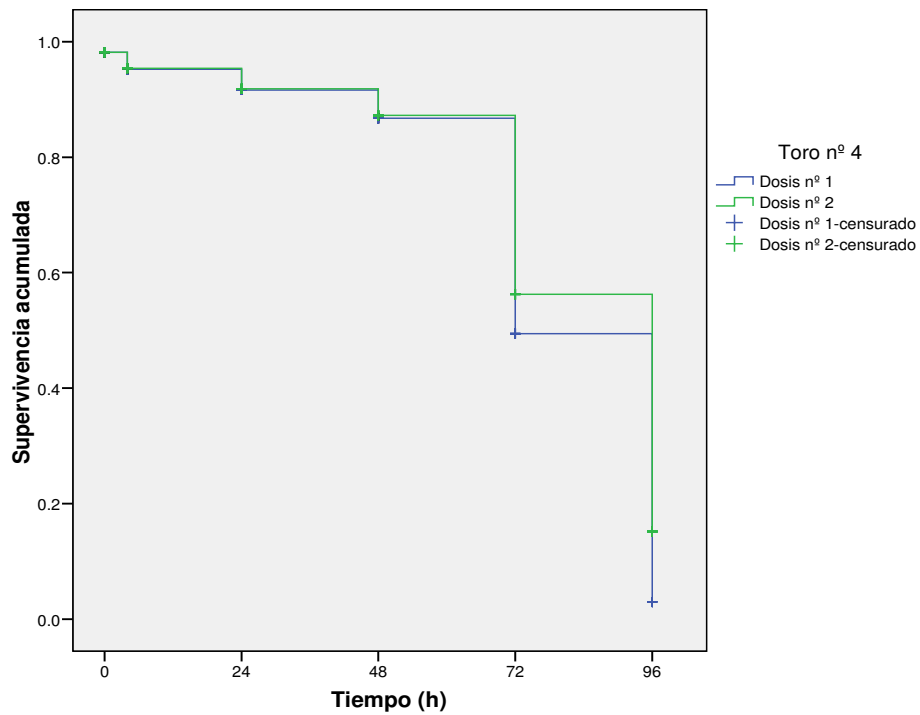


Figura 34. Dinámica de fragmentación del ADN espermático a 22 °C de 2 dosis seminales criopreservadas del mismo eyaculado del toro nº 4.

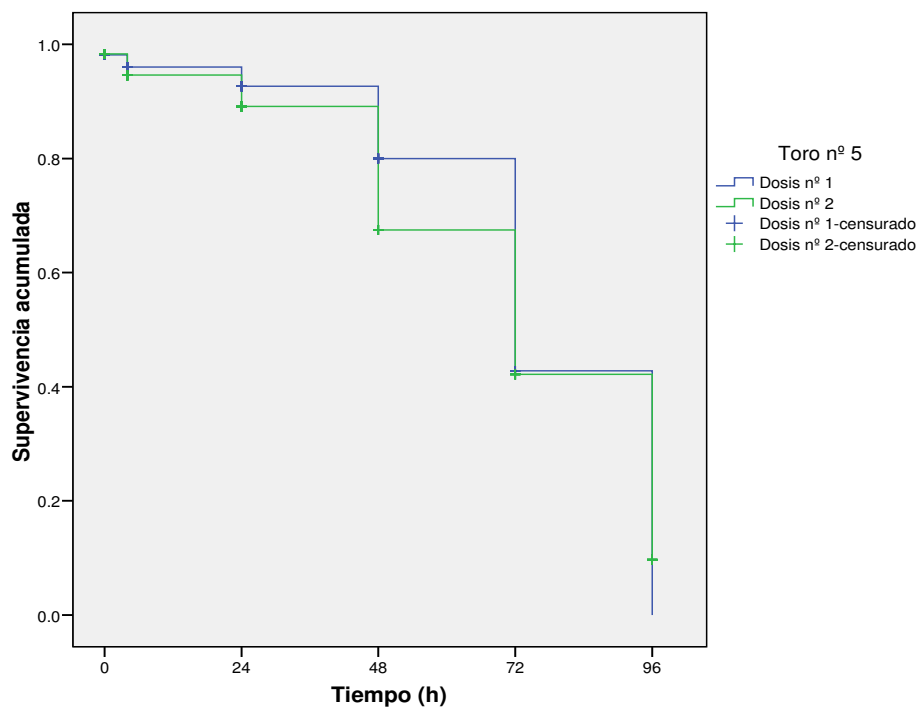


Figura 35. Dinámica de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas del mismo eyaculado del toro nº 5.

3.2.2.- Estudio comparativo de dosis seminales procedentes de eyaculados diferentes del mismo semental.

Se han analizado los resultados de las dinámicas de fragmentación del ADN espermático durante 96 h de incubación *in vitro* a 38,6 °C de 35 dosis criopreservadas pertenecientes a eyaculados extraídos en épocas diferentes (mínimo 3 meses entre cada extracción) de 7 toros de la raza de Lidia (Toro A, N=10; Toro B, N=8; Toro C, N=5; Toro D, N=2; Toro E, N=2; Toro F, N=5; Toro G, N=3).

El análisis estadístico mostró diferencias significativas ($P < 0,001$) entre las dosis criopreservadas de eyaculados diferentes del mismo toro en todos los casos (Figuras 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43).

Estos resultados indican que el momento de extracción seminal influye sobre la dinámica del IF de un mismo semental.

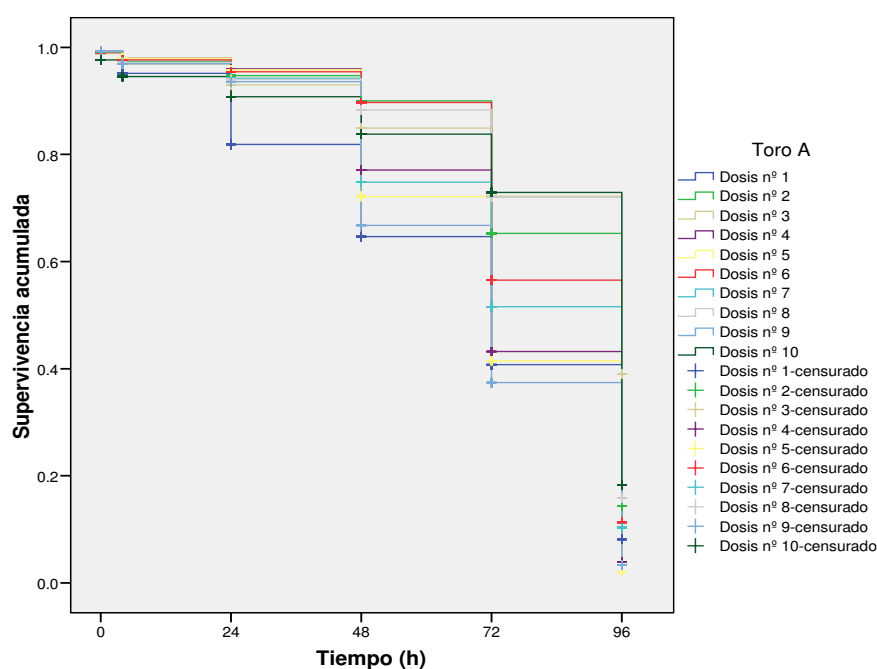


Figura 36. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 10 dosis seminales criopreservadas de eyaculados diferentes del Toro A.

Resultados

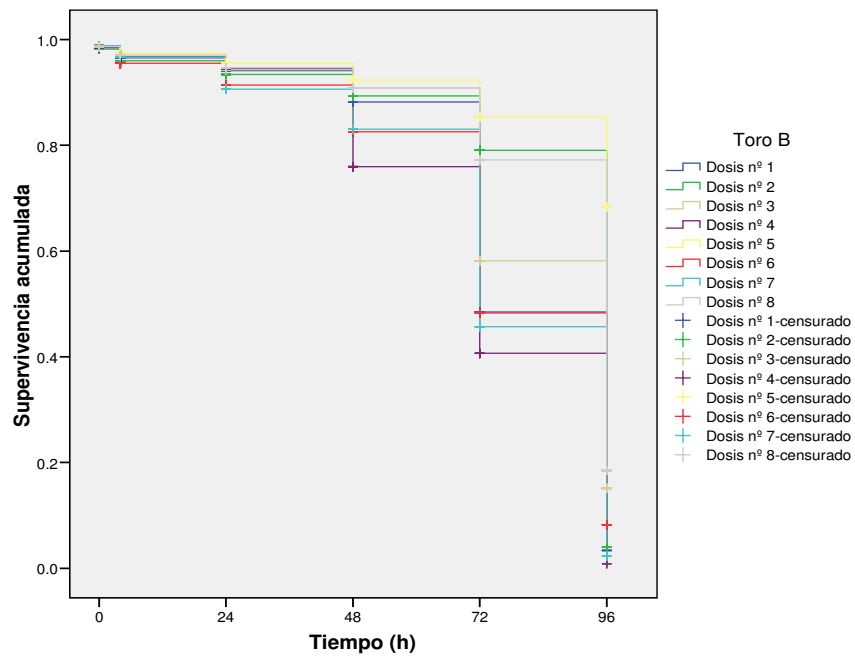


Figura 37. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 8 dosis seminales criopreservadas de eyaculados diferentes del Toro B.

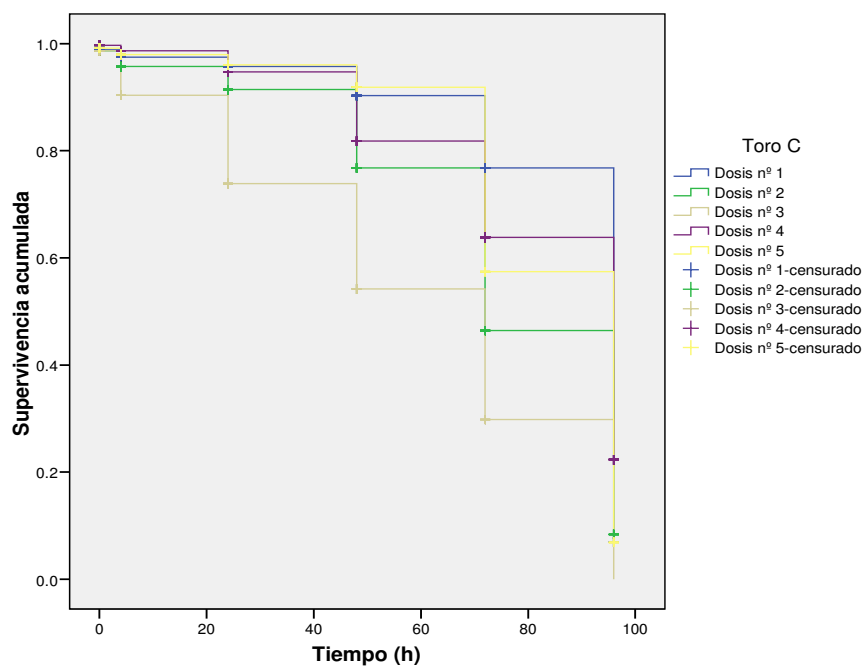


Figura 38. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 5 dosis seminales criopreservadas de eyaculados diferentes del Toro C.

Resultados

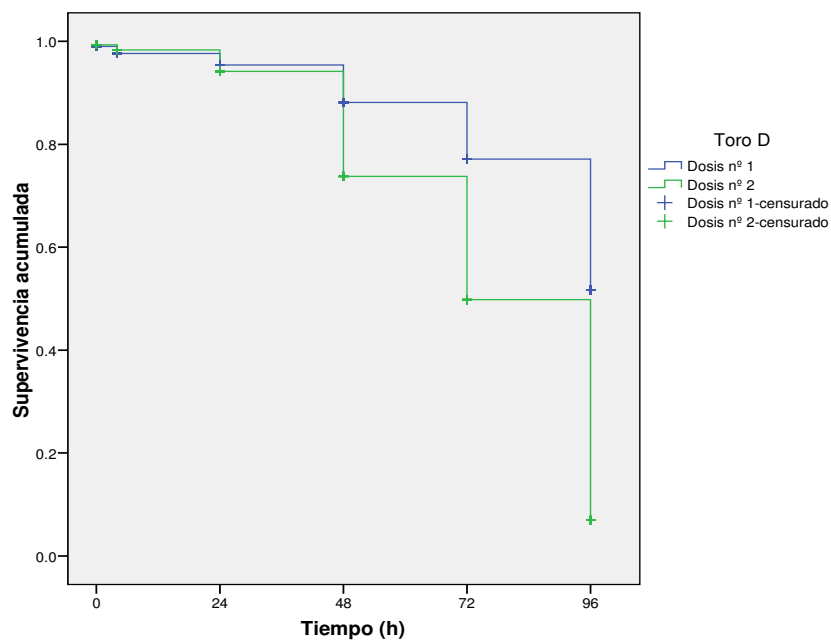


Figura 39. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas de eyaculados diferentes del Toro D.

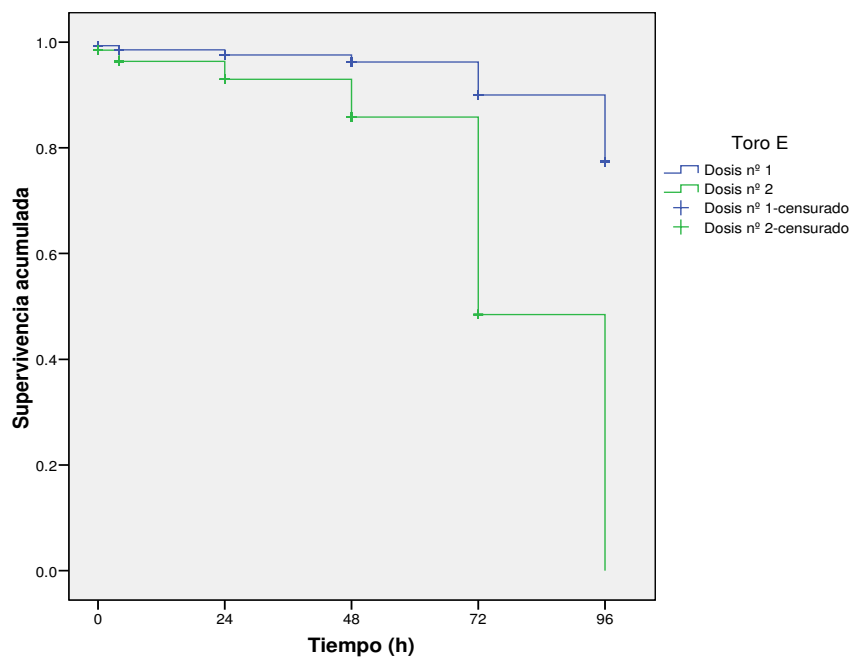


Figura 40. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas de eyaculados diferentes del Toro E.

Resultados

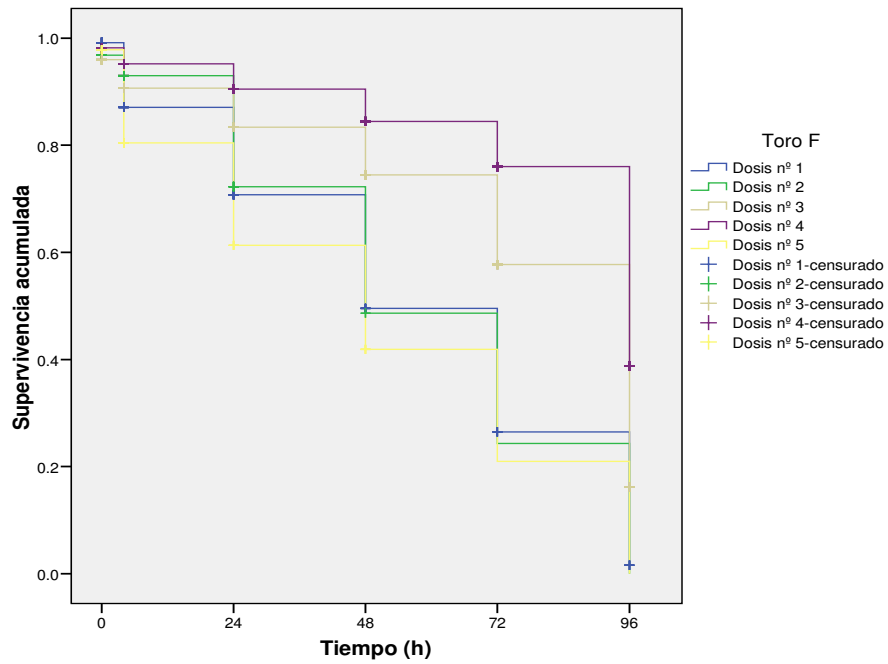


Figura 41. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 5 dosis seminales criopreservadas de eyaculados diferentes del Toro F.

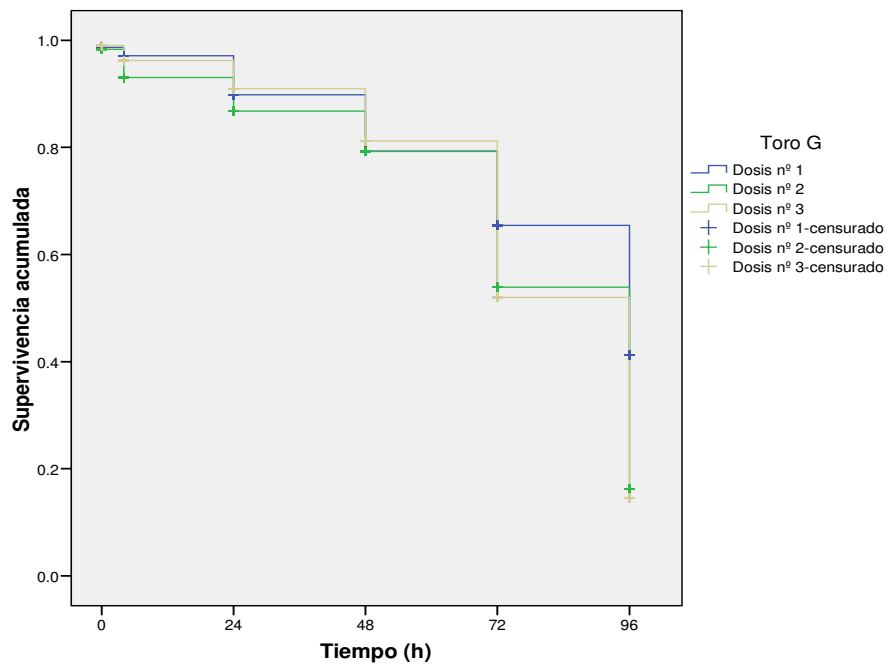


Figura 42. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 3 dosis seminales criopreservadas de eyaculados diferentes del Toro G.

3.3.- Estudio comparativo en dosis seminales obtenidas por vagina artificial y por electroeyaculación.

Se comparó la dinámica de fragmentación del ADN espermático de 12 dosis criopreservadas obtenidas de eyaculados extraídos mediante vagina artificial (VA) y electroeyaculación (EE) a 6 toros de la raza Blanca Cacerña (BC) con 7 días de diferencia entre cada una de ellas.

Se realizó la incubación *in vitro* a 38,6 °C desde el momento de la descongelación hasta las 96 h de incubación y se observó (Tabla 13) que para las 6 dosis obtenidas por vagina artificial el IF inicial de $9,39\% \pm 5,39\%$ aumentó hasta el $31,83\% \pm 12,13\%$ (media \pm desviación estándar) y para las 6 dosis extraídas por electroeyaculación se obtuvo un IF inicial del $8,50\% \pm 3,23\%$ que aumentó hasta $34,83\% \pm 16,21\%$ (media \pm desviación estándar).

Tabla 13. Dinámica de fragmentación del ADN espermático de dosis pertenecientes a 6 toros de la raza Blanca Cacerña por vagina artificial (N=6) y por electroeyaculación (N=6) a 38,6 °C.

T°38,6 °C	0h	4h	24h	48h	72h	96h
VA	9,39 \pm 5,39	14,22 \pm 5,17	18,17 \pm 6,64	20,61 \pm 8,19	25,39 \pm 10,04	31,83 \pm 12,13
EE	8,50 \pm 3,23	9,67 \pm 2,60	11,50 \pm 2,32	16,11 \pm 3,71	24,28 \pm 9,86	34,83 \pm 16,21

Los valores son media \pm DS

Se realizó la función de supervivencia Kaplan Meier para determinar el efecto del método de extracción, no encontrándose diferencias significativas ($P > 0,05$) en la dinámica de fragmentación entre las dosis de cada toro (Figuras 44, 45, 46, 47, 48, 49).

Los resultados muestran que el método de extracción seminal no influye en la dinámica de fragmentación del ADN espermático.

Resultados

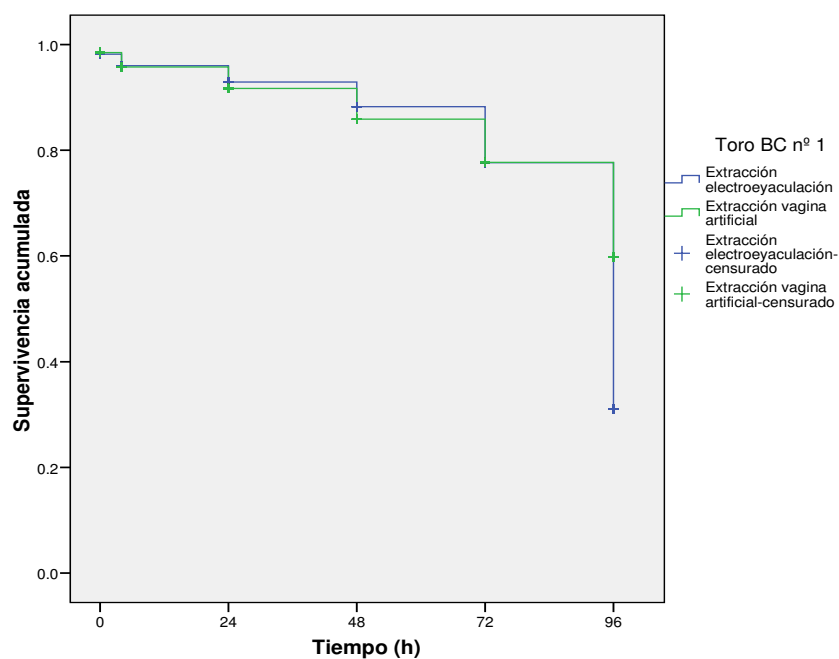


Figura 43. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas de los eyaculados extraídos por electroeyaculación (N=1) y vagina artificial (N=1) del toro BC nº 1.

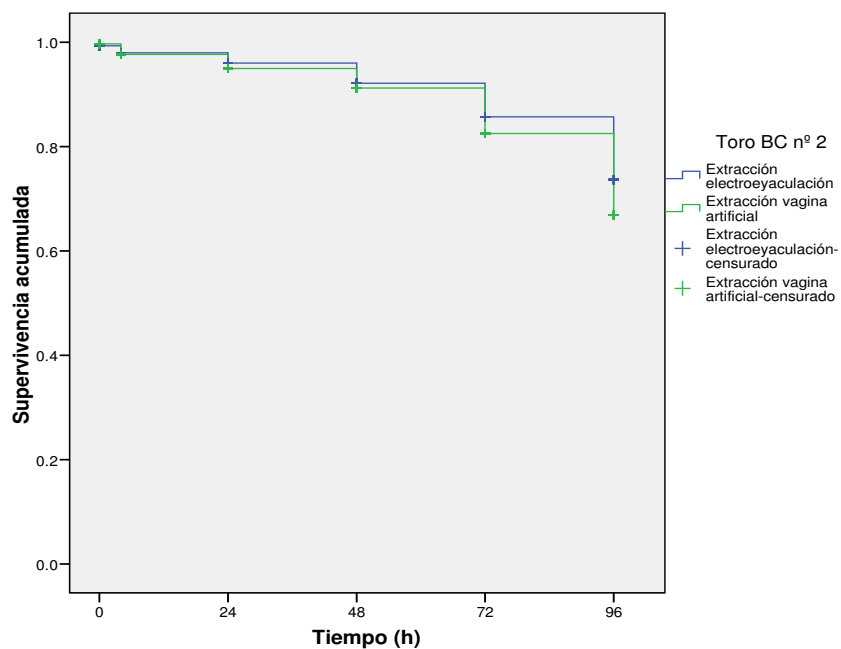


Figura 44. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas de los eyaculados extraídos por electroeyaculación (N=1) y vagina artificial (N=1) del toro BC nº 2.

Resultados

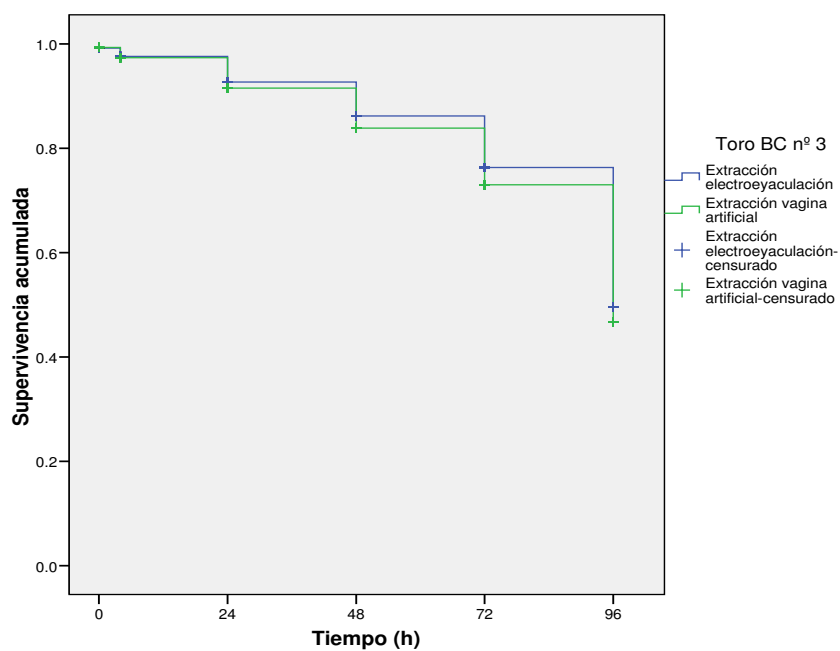


Figura 45. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas de los eyaculados extraídos por electroeyaculación (N=1) y vagina artificial (N=1) del toro BC nº 3.

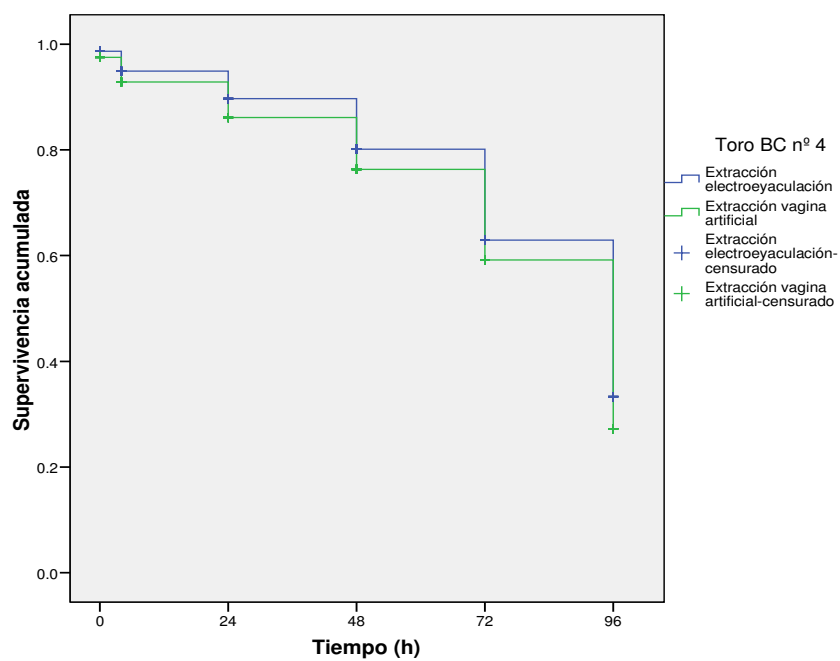


Figura 46. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas de los eyaculados extraídos por electroeyaculación (N=1) y vagina artificial (N=1) del toro BC nº 4

Resultados

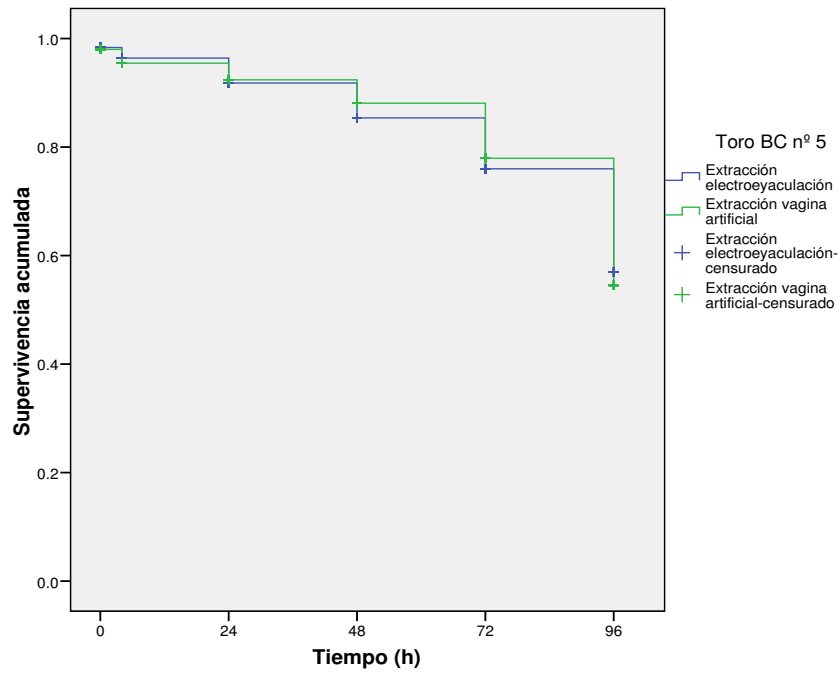


Figura 47. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas de los eyaculados extraídos por electroeyaculación (N=1) y vagina artificial (N=1) del toro BC nº 5.

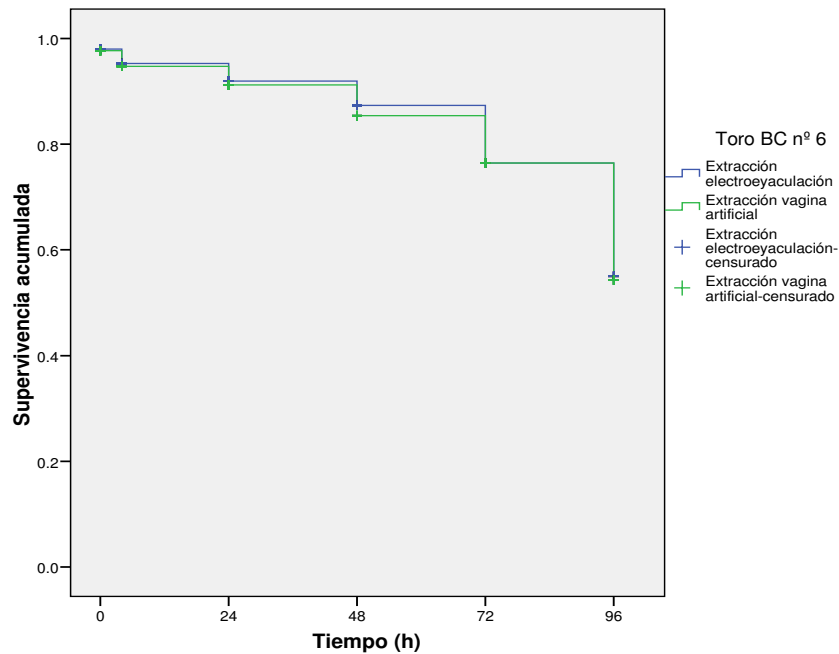


Figura 48. Dinámicas de fragmentación del ADN espermático a 38,6 °C de 2 dosis seminales criopreservadas de los eyaculados extraídos por electroeyaculación (N=1) y vagina artificial (N=1) del toro BC nº 1

DISCUSIÓN

1.- CARACTERÍSTICAS DEL ADN ESPERMÁTICO BOVINO.

1.1.- Validación de la técnica SCD en bovino.

En este trabajo, se comprobó la eficacia de dos técnicas diferentes: el test SCD (Fernández y col., 2007) y el Ensayo Cometa neutro (Singh, y col., 1988; Slowinska y col., 2008; Speit y col., 2009; Enciso y col., 2009) para analizar la fragmentación del ADN espermático de ganado bovino. Ambas técnicas detectan la presencia o no, de roturas en el ADN nuclear a través de los residuos cromatínicos que surgen de la extracción de las proteínas, tras completarse el proceso de lisis (Fernández y col., 2007; Gosálvez y col., 2013). Aquellos espermatozoides que tienen su ADN intacto liberan los bucles de ADN disponiéndose alrededor de la matriz nuclear, pero en el caso de estar fragmentado, los bucles se liberan junto con los fragmentos de ADN adheridos a ellos dispersándose, de forma irregular en el caso del Test SCD y migrando en el caso del Ensayo Cometa.

Las dos técnicas revelan esta alteración, ya sea variando la morfología de los cometas o el tamaño de los halos en función del número de roturas existentes en el ADN.

Los resultados indican la existencia de una asociación directa entre los espermatozoides con el ADN fragmentado y la presencia de halos grandes de dispersión de cromatina alrededor del núcleo (Test SCD) como de cometas de longitud variable (Ensayo de Cometa neutro).

La interpretación de los resultados tras realizar el Test SCD fue sencilla, se observaron imágenes donde los núcleos y distribución del ADN de cada célula, presentaron un aspecto similar a las obtenidas en otras especies como el verraco, el ratón o la oveja (Rodríguez y col., 2005; Enciso y col., 2006b; López-Fernández y col., 2007). Los morfotipos nucleares con fragmentación del ADN fueron muy evidentes en aquellos donde la cromatina estaba muy degradada y, por tanto, muy dispersa. El morfotipo de esta dispersión fue similar a la diversidad de morfologías en forma de cola de cometa, que presentó la muestra tras realizar el Ensayo Cometa neutro.

El 85% y 87% de los espermatozoides presentaron núcleos con el ADN muy disperso alrededor de la cabeza del espermatozoide tras realizar, el Test SCD y el Ensayo Cometa neutro, respectivamente, relacionándose ambos resultados con la fragmentación del ADN espermático presente en la muestra analizada. Estos mismos resultados ya se han encontrado en otras especies de mamíferos (Cortés-Gutiérrez y col., 2008; Zee, y col., 2009; Pérez Llano y col., 2010; Gosálvez y col., 2011a).

Además, se comprobó que el Test SCD identifica una clase de espermatozoides caracterizados por roturas simples y/o dobles en la cadena de ADN de dosis seminales de toro de Lidia en concordancia con otros autores (Gosálvez y col., 2007; Martínez-Pastor y col., 2009). Se reveló como una técnica rápida, económica y de sencilla interpretación, que sin un equipamiento laboratorio especial y aplicando la metodología especificada en este trabajo, es una herramienta muy útil para complementar la evaluación rutinaria de la calidad seminal en bovino (Gosálvez y col., 2011c).

1.2.- Índice de fragmentación basal del ADN espermático bovino.

Como ya planteamos anteriormente, el objetivo fundamental de esta tesis, es conocer mejor la calidad espermática del semen de ganado vacuno. El seminograma clásico de la especie bovina debe recoger, al menos, los siguientes parámetros: volumen, concentración, movilidad masal y progresiva, morfología y viabilidad (Christensen y col., 1999). Sin embargo, en los últimos años, un nuevo parámetro, la fragmentación del ADN espermático, se está teniendo en cuenta cuando hablamos de calidad seminal. Por ello, en primer lugar, se determinó el nivel basal de IF medio del eyaculado de los toros muestreados.

Se utilizaron muestras criopreservadas de toros de la raza de Lidia, Blanca Cacerreña y de razas especializadas (Charolais, Limousin, Holstein) y los resultados mostraron un IF del 8,08% coincidente con Januskauskas y col., (2001) que utilizando la técnica SCSA y Addad y col., (2009) usando el TUNEL, señalaron un IF del 8,00% y 8,80%, respectivamente; y Dobrinski y col., (1994) y Malama y col., (2012) que estimaron como satisfactoria una media del 7% con SCSA.

Trabajos anteriores demostraron que existe una fuerte asociación negativa entre el nivel de IF y la fertilidad del toro (Ballachey y col., 1987; Bochenek y col., 2001; Januskauskas y col., 2003; Fraser, 2004; Fatehi y col., 2005; Waterhouse y col., 2006; Rybar y col., 2010; Karoui y col., 2012), y que valores elevados de IF en el eyaculado del toro provocan un descenso en la fecundación, la calidad embrionaria (Waterhouse y col., 2006; Rybar y col., 2010) y la capacidad de desarrollo de embriones bovinos *in vitro* (Evenson y Wixon, 2006; Kasimanickam y col., 2006; D'Occhio y col., 2007; Khalifa y col., 2008). Esta correlación también ha sido establecida en condiciones experimentales. Fernández-González y col., (2008) tras inducir daño en el ADN del genoma paterno de ratón, demostraron una fuerte relación entre la fragmentación del ADN espermático y el desarrollo embrionario y la existencia de malformaciones en los recién nacidos e incluso en las generaciones siguientes.

Dado que en nuestro estudio no se pudo relacionar el nivel de IF de las dosis analizadas con datos de fertilidad de hembras inseminadas, fue imposible determinar el umbral a partir del cual la fragmentación del ADN espermático podría llegar a jugar un papel importante en la infertilidad bovina. Rybar y col., (2004) han propuesto un valor aproximado del 4% para toros fértiles (N=31) y un 14,20% para toros subfértiles (N= 6), defendiendo que valores de IF inferiores al 15-20% no supondrían retrocesos apreciables en la fertilidad, pero sí los superiores al 20% que causarían un impacto negativo del 10% sobre la tasa de preñez. Asimismo, Rybar y col., (2004) estimó que una dosis tendría comprometida su fertilidad con un $IF \geq 20\%$, mientras que Dobrinski y col., (1994) bajan ese valor al 13% y Bochenek y col., (2001) lo elevan hasta un 25% de anomalías en la cromatina bovina.

En nuestro caso, aplicando las consideraciones de Rybar y col., (2004) de las 150 dosis seminales analizadas, un 95,34% % (N=143) presentaron valores aceptables de IF (<20%) y un 4,70% (N=7) superaron ese umbral, siendo consideradas como dosis con una integridad del ADN espermático pobre. Destacar el hecho de que este último grupo de dosis, pertenecen a sementales de la raza Blanca Cacerña, lo que indica que del total de dosis analizadas de esta raza (N=40) un 17,50% son susceptibles de poseer un bajo potencial de fertilidad, lo que podría

explicarse por la escasez de sementales disponibles y los altos niveles de consanguinidad de la raza (Bartolomé y García, 1998; Calero y col., 2007) que obliga a aceptar como reproductores animales de calidad seminal dudosa (Apartado Introducción 2.4).

Comparando los niveles de fragmentación basal obtenidos en ganado bovino, con otras especies ganaderas, podemos comprobar la existencia de diferencias inter-específicas. Así, con respecto al morueco, otra especie rumiante, se observó que éste presenta un IF basal similar al obtenido en este estudio. Los resultados de Gosálvez y col., (2008) mostraron una media de IF del $6,40 \pm 7,90\%$ (N=113); Enciso y col., (2009) obtuvo un IF de $5,94 \pm 0,77\%$ (N=70), similar a López-Fernández y col., (2008a) que indicaron un IF inferior al 5% en la mayoría de los individuos analizados (N=25) y Enciso (2010) utilizando dos técnicas diferentes en 20 individuos obtuvieron un $7,26 \pm 2,19\%$ con el Test SCD y un $8,06 \pm 2,01\%$ con el ensayo ISNT (N=20). Sin embargo, García-Macías y col., (2006a) encontraron un IF basal más bajo para el morueco ($1,80 \pm 0,40\%$; N=17).

Por otro lado, los valores basales descritos de IF en el verraco son inferiores al toro, del 5% (Martínez, 2005; Boe-Hansen y col., 2005; Pérez-Llano y col., 2006; López-Fernández y col., 2008b) o del 6%, como máximo (Didion y col., 2009). Otros autores incluso han bajado esa cifra al 2,1% (Enciso y col., 2006b, 2009), situando el umbral de riesgo para la fertilidad del verraco en un IF máximo del 8% (Rybar y col., 2004; López-Fernández y col., 2008a; López-Fernández y col., 2008b), bastante inferior al del toro.

Al revisar la bibliografía existente sobre sementales equinos, se observó que poseen una tasa basal de IF más alta que el resto. Morrel y col., (2008) establecieron un rango del 4,80%-19,00% (N=37) y Enciso (2010), utilizando las técnicas SCD y el ISNT, obtuvo un $10,35\% \pm 1,95\%$ y un $11,11\% \pm 2,27\%$, respectivamente, sobre una muestra de 19 ejemplares. Estos valores son similares a los obtenidos por López-Fernández y col., (2007), que obtuvieron un IF del $14,20\% \pm 8,80\%$ (N=23) y Cortés-Gutiérrez y col. (2007) que obtuvieron un $13,00\% \pm 6,05\%$ (N=4) en caballo y un $12,25\% \pm 7,41\%$ (N=4) en burros de raza Zamorano-Leonesa. Al año siguiente, estos mismos autores encontraron resultados más elevados en 20 burros de la misma raza:

Discusión

un IF del $18,20\% \pm 14,77\%$ aplicando la técnica SCD y un $22,00\% \pm 19,34\%$ con el Ensayo Cometa (Cortés-Gutiérrez y col., 2008). Con respecto al umbral fértil en esta especie, Love y Kennedy (2005) asociaron un 25% de anomalías en la cromatina espermática con una baja fertilidad.

Desde el punto de vista de la fragmentación del ADN nuclear, las diferencias inter-especie podrían asociarse a las variaciones específicas existentes en las condiciones de desproteización del ADN espermático, ya que cada especie posee diferentes tipos y proporciones de protaminas en su cromatina espermática (Ausió y col., 2007). Además, en cada especie, el proceso de maduración de los espermatozoides a través del epidídimo tiene unas características propias que incluye, el lugar del epidídimo donde sucede la condensación principal de la cromatina (Golan y col., 1996).

Por otro lado, desde un punto de vista zootécnico, la selección de los sementales es diferente en cada especie. En el verraco se viene realizando sistemáticamente tanto por calidad seminal como fertilidad. Así, antes de ser aprobado como futuro reproductor, debe cumplir con unos requerimientos sanitarios y además tener una buena aptitud para la extracción de semen, una buena calidad seminal y presentar valores óptimos de los índices de fertilidad. En el caso del morueco, debe ser mejorante del rebaño que se desea inseminar, por lo que es necesario conocer el nivel genético del individuo y su proporción en los descendientes. Frente a estos procedimientos, la selección de semental en los equinos se realiza por aptitud y conformación, nunca por fertilidad, situación similar a lo que ocurre en las razas bovinas de extensivo analizadas en este estudio, donde las características morfológicas y genéticas se anteponen al potencial fértil del animal.

A pesar de ello, la eficiencia reproductiva o fertilidad del toro es uno de los principales factores a tener en cuenta en las ganaderías de extensivo, pues la reproducción es un factor clave que condiciona sobremanera la producción final del rebaño y la rentabilidad económica de toda la explotación. La tasa de preñez en estos rebaños oscila entre un 50%-65% y depende, casi exclusivamente, de la calidad y capacidad funcional del espermatozoide del macho. Teniendo en cuenta esta influencia y que el 4,70% de las dosis analizadas en este trabajo presentaron un IF más elevado de lo

normal ($IF \geq 20\%$), se recomienda la incorporación del IF como un parámetro complementario a incorporar al panel de pruebas rutinarias de calidad seminal que se analizan en toros con un propósito reproductivo.

1.3.- Correlación entre el IF y otros parámetros de calidad seminal en las razas de Lidia y Blanca Cacereña.

Según lo descrito en el apartado anterior, no cabe duda de que la fragmentación del ADN espermático guarda relación con la capacidad de fertilización de los machos. Sin embargo, un aspecto interesante es comprobar si este parámetro presenta algún tipo de correlación con los analizados en el espermiograma clásico.

Algunos estudios previos consideran la fragmentación del ADN como un marcador independiente de los valores estándar incluidos en un espermiograma (Zini y col., 2001; Evenson y col., 2002; Pérez-Llano y col., 2006). Otros, sin embargo, establecen distintos niveles de correlación entre algunos parámetros de calidad seminal (volumen, movilidad, velocidad, morfología, viabilidad) y el IF (Ballachey y col., 1988; Giwercman y col., 2003; Januskauskas y col., 2003; Kasimanickam y col., 2006; Khalifa y col., 2008; Addad, 2009; Nava-Trujillo y col., 2011; Nagy y col., 2013).

No debe sorprender esta variabilidad, pues existen muchos factores que influyen sobre los resultados. Por ejemplo, el alto grado de variación biológica existente en el análisis seminal, tanto inter como intra laboratorio (Álvarez y col., 2003), por la aplicación de diferentes técnicas de análisis, sobre poblaciones de individuos no homogéneos y porque a nivel individual el daño en el ADN puede originarse tanto por factores testiculares como extratesticulares.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican correlaciones entre el IF ($P < 0,05$) y tres parámetros espermáticos: movilidad masal, anomalías morfológicas y viabilidad espermática postdescongelación.

De todos los parámetros de movilidad analizados, únicamente se encontró correlación positiva (Rho , $P < 0,05$) entre el IF y la movilidad masal y fueron valores muy bajos, coincidiendo con Addad (2009) y difiriendo de otros autores que sí la encontraron (Ballachey y col., 1988; Peris y col., 2004; Nava-trujillo y col., 2011;

Nagy y col., 2013). Algunos, incluso, describen una correlación única entre el daño del ADN espermático y la movilidad (Gandini y col., 2000, Giwerman y col., 2003).

Entre las anomalías morfológicas de los espermatozoides y el IF existe una correlación baja de signo negativo ($Rho, P < 0,05$), y, como en el caso anterior, existen estudios que revelan una fuerte asociación entre la morfología y la integridad de la cromatina espermática en el toro (Ballachey y col., 1987; Dobrinski y col., 1994; Karabinus y col., 1997; Ostermaier 2001; Rybar y col., 2010; Enciso y col., 2011a; Nagy y col., 2013). En concreto, fueron asociadas las formas dobles, cabezas de base estrecha, cabezas pequeñas, cola corta y gota citoplasmática proximal, a espermatozoides con el ADN fragmentado (Enciso y col., 2011a). Otros opinan lo contrario, sugiriendo que dicha relación no es consistente y atribuyendo sus resultados al hecho de que las alteraciones en la cromatina no tienen que ir necesariamente asociadas a las alteraciones morfológicas (Giwercman y col., 2003; Beletti y col., 2005; Addad, 2009).

Tanto las anomalías morfológicas como el daño en el ADN pueden desencadenarse en la espermatogénesis, cuando se produce el cambio de histonas-protaminas por enzimas que cortan y ligan el ADN para que se produzca su torsión. Fallos en la reparación de esas roturas pueden causar una maduración incompleta de la cromatina dando lugar a anomalías morfológicas (Marcon y Boissonneault, 2004). El exceso de ROS generado por una infección, una respuesta inflamatoria o la presencia de espermatozoides inmaduros con una excesiva retención citoplasmática provocan anomalías morfológicas (Agarwall y col., 2003). Y con respecto a la apoptosis celular, se ha comprobado que, las cadenas rotas presentes en los espermatozoides con anomalías morfológicas fueron análogas a las existentes en las células somáticas con este fenómeno (Gorcyca y col., 1993).

El IF también se correlaciona de forma moderada y negativa ($Rho, P < 0,05$) con los espermatozoides viables postdescongelación. Esta relación ha sido descrita con frecuencia en la bibliografía (Ballachey y col., 1988; Januskauskas y col., 2003; Beletti y Mello, 2004; Peris y col., 2004; Nava-Trujillo y col., 2011). En contraposición, otros autores no encontraron esa correlación (Karabinus y col., 1991; Addad, 2009; Enciso, 2010), sugiriendo como posible explicación que ni todos los

espermatozoides inviábiles contenían ADN fragmentado ni todos los espermatozoides viables estarían libres de daño en el ADN. Esta hipótesis fue corroborada en un estudio realizado con esperma sexado de toro (Gosálvez y col., 2011c), concluyendo, por tanto, que ambos parámetros tendrían comportamientos independientes (Gosálvez y col., 2009).

Independientemente de las relaciones fisiológicas, esta diversidad de resultados podría guardar relación con, la inexistencia de un sistema de clasificación homogéneo (Barth y Oko, 1989; Saacke, 1990), el tipo de valoración realizada por los técnicos (García-Macías y col., 2007) e incluso por el propio análisis de las anomalías morfológicas y del IF, que, como indicaron Enciso y col., (2011a), se realiza en la misma muestra de semen pero no en la misma célula espermática (al no encontrarse esta relación en el eyaculado del toro, pero si, en el subgrupo de espermatozoides que contenían un elevado porcentaje de IF).

Se sugiere que, la movilidad masal, anomalías morfológicas y viabilidad postdescongelación podrían estar relacionadas con el IF, pero no ser concomitantes, esto es, se consideraría al IF como un parámetro independiente de la evaluación espermática y, por tanto, un espermatozoide aparentemente normal podría tener el ADN fragmentado y presentar problemas en la fertilización. Queda claro que, a excepción de la viabilidad espermática postdescongelación, nuestros resultados indican una baja correlación con los parámetros estudiados en el seminograma clásico, de ahí que sea de suma importancia incluir el estudio de los niveles de fragmentación espermáticos como información complementaria a la obtenida en el resto de parámetros. El análisis de semen y la evaluación de la fragmentación del ADN miden aspectos diferentes pero complementarios de la capacidad fertilizante de los espermatozoides, con lo cual no debería obviarse su evaluación pues concede mayor fiabilidad a la decisión final sobre la utilidad o no de los eyaculados.

2.- FACTORES QUE PUEDEN INFLUIR EN LA CALIDAD SEMINAL DE LAS RAZAS DE LIDIA Y BLANCA CACEREÑA.

2.1.- Influencia de la raza bovina.

Al analizar los resultados de los espermiogramas en función de la raza de procedencia -raza de Lidia (RL), Blanca Cacerena (RB) y razas especializadas (RE)-, encontramos diferencias significativas entre los 3 grupos de razas para el volumen, IF y anomalías morfológicas post descongelación.

Con respecto al IF, la RB ($13,97\% \pm 9,03\%$) se diferenció significativamente ($P < 0,001$) de la RL ($6,05\% \pm 3,10\%$) y RE ($5,42\% \pm 4,20\%$). Sin embargo, Rybar y col., (2010) estudiaron los niveles de IF entre las razas lecheras Czech Spotted y Holstein, no encontrando diferencias significativas ($5,30\% \pm 3,70\%$). Este resultado puede explicarse porque la metodología de selección de los sementales suministradores de dosis seminales de alto valor comercial de las razas lecheras citadas es totalmente diferente al de las razas vacunas extensivas de este estudio, que, además, presentan singularidades de selección del semental muy concretas en el caso de la RL y la RB (Introducción: 1.4 y 2.4). De hecho, a la RB pertenecen los ejemplares con los valores de IF más elevados de todo el estudio.

Sin embargo, los resultados obtenidos para la RB no difirieron demasiado de los obtenidos por Enciso y col., (2011a) en dosis congeladas de la raza Holstein-Friesian (N=17) usando dos técnicas de análisis diferentes: $11,35 \pm 2,81\%$ (SCD) y $12,18 \pm 2,90\%$ (ISNT); ni del indicado por Fernández-Santos (2009) que estimó un IF basal del $11,70\% \pm 0,50\%$ (N=3) en la misma raza.

Esta similitud en el IF entre los resultados obtenidos por otros autores en Holstein y la RB podrían estar relacionados con problemas derivados de la endogamia, que provoca un impacto negativo en la fertilidad y mayor incidencia de fallos reproductivos, descritos ambos tanto en la RB como en Holstein (Bartolomé y García, 1992; Calera y col., 2007; Parland y col., 2007).

Otros autores, han descrito valores similares a la RL y RE como Rybar y col., (2004, 2010), que obtuvieron un IF del $5,70 \pm 4,40\%$ ($1,50\%$ - $20,80\%$) en la raza

Simmental (N=37) y 5 años después en dos razas lecheras (Czech Spotted y Holstein) un $5,30\% \pm 3,70\%$ ($1,60\%-20,8\%$) (N=47).

También Waterhouse y col., (2010) obtuvieron en las razas Holstein (N=20) y Norwegian Red (N=20) una media de IF del $5,10\% \pm 2,30\%$ y $5,70\% \pm 4,00\%$, respectivamente. Similares a los descritos por Nava-Trujillo y col., (2011) en toros de la raza Brahman que encontraron un $4,17\% \pm 2,96\%$ (N=6); mientras que, Addad (2009) en toros de la raza Nelore halló valores algo más elevados: $8,80 \pm 3,80\%$ (N=46), al igual que Januskauskas y col., (2001), con un $8,00 \pm 1,60\%$ (N=20) en la raza Swedish Red and White. Sin embargo, dos años más tarde, estos últimos autores obtuvieron en la misma raza un IF inferior: $2,60\% \pm 1,55\%$ ($1,17\%-7,50\%$, N=18), sin ofrecer una explicación concluyente de la diferencia de resultados.

Para la RL también se han publicado valores medios del IF inferiores al 2% (Martínez-Pastor y col., 2009), posiblemente debidos al bajo número de muestras analizadas (N=3), ya que en nuestros resultados, un porcentaje de las dosis de esta raza también mostraron esos niveles.

Otros autores encontraron también bajos niveles basales de IF en otras razas bovinas como la Swedish Red and White con un rango de IF del $0,50\%-3,60\%$ (N=6), la Estonian-Holstein con un $0,40\%-1,80\%$ (N=6) (Hallap y col., 2004); la Nelore con un $1,60\% \pm 1,70\%$, (Silva y col., 2002) y la “Swamp buffalo” o búfalo del pantano con un $IF < 3\%$ en un rango del $0,19\%-7,92\%$ (N=18) (Koonjaenak y col., 2007).

De todo lo anterior se infiere que la influencia del factor raza sobre el IF es indudable, presentando además una alta variabilidad que oscila entre el $1,06\%$ de la raza Nelore (Silva y col., 2002) y el $13,97\%$ de la RB de este estudio. Esta variabilidad puede guardar relación con la gran amplitud porcentual de gametos con cromatina fragmentada que presentan los individuos incluso dentro de una misma raza, hipótesis ya planteada por otros autores (Gillan y col., 2008; Khalifa y col., 2008; Waterhouse y col., 2010).

Discusión

En nuestro estudio la RB presentó el rango más amplio (2,00%-36,33%), similar al descrito en 8 toros de razas diferentes (1,20%-23,80%) por Bochenek y col., (2001) y en la raza Simmental (1,60%-20,80%) por Rybar y col., (2010).

Respecto al resto de parámetros seminales, señalar que se encontraron diferencias significativas ($P<0,001$) tanto en el volumen seminal como en la presencia de anomalías morfológicas postdescongelación entre las tres razas estudiadas, estableciéndose paralelismos y diferencias con otras razas autóctonas españolas criadas en condiciones extensivas similares.

Al valorar el volumen seminal, se observaron diferencias entre los toros de la RE (17 ml) y el resto, ya que prácticamente duplicaron el volumen obtenido de los toros RL (8,37 ml) y RB (8,89 ml). Este resultado podría deberse a las diferencias raciales morfológicas existentes entre ellos, ya que los toros RE, debido a la fuerte presión de selección a la que son sometidos son de mayor envergadura, poseen una circunferencia y un volumen escrotal mucho mayor y ello conlleva una mayor secreción de fluidos del epidídimo, glándulas accesorias y parénquima testicular.

Nuestros resultados fueron ligeramente inferiores a los obtenidos en otras razas autóctonas (Alistana-Sanabresa, Vianesa, Cachena, Caldelana, Sayaguesa y Marismeña) en las que se han descrito volúmenes comprendidos entre 9,37 ml y 11,26 ml (Sánchez-García y col., 1992;

Vallecillo, 2011) pero, fueron superiores a los indicados para las razas Asturiana de los Valles (5,00 ml) y Rubia Gallega, con un rango de 5,69-6,29 ml (Muiño y col., 2006 y 2009).

La concentración espermática obtenida en la RL, RB y RE ($0,98\times 10^9$, $0,94\times 10^9$ y $0,62\times 10^9$ respectivamente) fue inferior que en otras razas autóctonas: Vianesa: $1,15-1,37\times 10^9$, Sayaguesa: $1,37\times 10^9$, Caldelana: $1,41\times 10^9$, Cachena: $1,44\times 10^9$ (Sánchez-García y col., 1992), Marismeña: $1,23\times 10^9$ (Vallecillo, 2011), Asturiana de los Valles: $1,17\times 10^9$ y Rubia Gallega: $1,30\times 10^9$ (Muiño y col, 2006, 2009).

Los resultados de movilidad masal en la RL y RE fueron prácticamente idénticos (1,68 y 1,75, respectivamente) pero no se pudieron realizar comparaciones porque la medición se realizó de forma diferente (escala 0-3) a la utilizada en otros

estudios. Sin embargo, la valoración realizada en la RB (3,74) fue con escala de 0-5, obteniéndose resultados similares a la raza Marismeña (3,64) y un mejor comportamiento que en otras razas (Vianesa: 2,52; Sayaguesa: 2,59; Caldelana: 2,45; Cachena: 2,25).

Para el resto de parámetros que implican movimiento (MI y MP), tanto la RL como la RB estuvieron por debajo de los señalados por Muiño y col., (2009) para la Asturiana de los Valles (MP =94,70%) pero de forma subjetiva, presentaron una densidad seminal similar a la Frisona (78%) y Rubia Gallega (83%) (Muiño y col., 2006). Sin embargo, los resultados de MP tras la descongelación de las dosis, fueron inferiores, del 57,28% en Frisona y del 58,35% en Rubia Gallega (Muiño y col., 2006), comportándose del mismo modo que en la RE pero inferiores a la RL.

Sí hubo diferencias ($P<0,001$) para las anomalías morfológicas postdescongelación encontradas en los tres grupos de razas estudiadas, en concreto, el valor para la RB (23,39%) fue muy superior al de RL (10,55%) y RE (9%), cercano al límite máximo del 30% de anomalías en un eyaculado normal con buena capacidad fertilizante. Sin embargo, la RL y RE tuvieron valores similares a los indicados para las razas Asturiana de los Valles con un 9,7% (Muiño y col., 2009) y Marismeña con el 9% (Vallecillo, 2011), ambas razas autóctonas explotadas también en régimen extensivo.

Si observamos con detalle el patrón de viabilidad obtenida tras la descongelación, en las dosis de RL, apreciamos que los resultados fueron aceptables, corroborando de nuevo, la criorresistencia de las dosis seminales de toro señalada por Slowinska y col., (2008), ya que, se obtuvo una viabilidad del 15,88%-23,77% (rango: 2,33%-61%), con una amplitud mayor pero similar a la descrita por Addad (2009) con un rango del 25%-50%.

De acuerdo con nuestros resultados, se podría afirmar que las características seminales, la calidad y la producción espermática de los toros RL, RB y RE son semejantes y se encuentran dentro de los rangos publicados por otros autores para el resto de razas autóctonas españolas citadas. Tan sólo se aprecian diferencias al alza en algunos parámetros cuantitativos para la RE, como el volumen de eyaculado, y en

los parámetros de calidad seminal, IF y anomalías morfológicas postdescongelación, para la RB, que podrían explicarse por los escasos efectivos con los que cuenta esta raza y, consecuentemente, por el alto nivel de consanguinidad que soporta (Bartolomé y García, 1998).

A pesar de la escasa bibliografía disponible al respecto, algunos autores opinan que la consanguinidad está altamente correlacionada con algunos defectos genéticos espermáticos, como la movilidad, la morfología y la descondensación de la cromatina (Baccetti y col., 2001; Latini y col., 2004; Van Eldik y col., 2006). En el caso concreto de la RB, podría asociarse con un componente genético (Salisbury y Baker, 1966; Barth y Oko, 1989; Chandler y Adkison 1990; Chenoweth, 2005) o por la asociación establecida entre la presencia de anomalías morfológicas en el eyaculado del toro y diferentes grados de consanguinidad (Baccetti y col., 2001; Van Eldik y col., 2006). Esto podría explicar el elevado porcentaje de IF y anomalías morfológicas tras la descongelación que se ha detectado en los sementales de esta raza, y que sobradamente justificaría la necesidad de practicar un espermograma completo a todas las muestras seminales almacenadas en el banco de germoplasma de la RB y conservar solamente aquellas pertenecientes a toros con características espermáticas aceptables.

En definitiva, la identificación y selección de toros sanos, con unas características reproductivas óptimas, incluido el mantenimiento de la integridad de su ADN espermático, se considera un factor clave para el desarrollo futuro de la ganadería bovina extensiva y de vital importancia para el mantenimiento y conservación de la diversidad ganadera. Para lograr este objetivo, incorporar el análisis del IF a las pruebas tradicionales de calidad seminal supondría crear un instrumento muy valioso para ejecutar con éxito el plan de IA que poco a poco se va instaurando en las explotaciones, ya que se perfeccionaría la selección de reproductores, descartando aquellas dosis seminales con altos niveles de defectos en el esperma, y se conseguiría una mayor eficacia en la aplicación de esta técnica de reproducción asistida, a la vez que se potencian todas sus ventajas en la explotación (mejora genética rápida, incremento rentabilidad, etc.).

2.2.- Influencia del método de extracción utilizado .

2.2.1.- Extracción seminal por vagina artificial frente a la electroeyaculación en la raza Blanca Cacerña.

Se realizaron dos colectas seminales, una por electroeyaculación (EE) y otra con vagina artificial (VA), a los mismos toros de la raza Blanca Cacerña (N=6) para estudiar las diferencias en las características del eyaculado, no encontrándose diferencias significativas ($P>0,05$) debidas al método empleado en ningún parámetro espermático analizado en semen fresco, ni tras la criopreservación (IF, volumen, concentración y parámetros de movilidad).

Con respecto a los parámetros seminales analizados no hubo diferencias significativas ($P>0,05$), dato que concuerda con Palmer (2005), que no halló diferencias ni en el volumen (VA: 11,42 ml *vs.* EE: 12,75 ml), ni en la concentración espermática (VA: 561,67 *vs.* EE: 692,75) y Jiménez-Rabadán (2013) en la raza ovina Manchega, tampoco halló diferencias en el volumen, en función del método.

Sin embargo este mismo autor, (Jiménez Rabadán, 2013) en otra especie, la cabra Blanca Celtibérica, si encontró diferencias en el volumen y concentración espermática (VOL: VA 1,10 ml *vs.* EE 2,00 ml y CC: VA 2487,20 *vs.* EE 1163,00 $\times 10^6$ esp/ml). En concordancia, con otros autores que en bovino, también las hallaron, tales como Austin y col., (1961) (VOL: VA 2,80 ml *vs.* EE 6,30 ml y CC: 625 $\times 10^6$ *vs.* 299 $\times 10^6$ esp/ml), Parpanov (2000) (VOL: VA: 3,10 ml. *vs.* EE: 6,40 ml y una CC de VA: 121 $\times 10^6$ *vs.* EE: 71,60 $\times 10^6$), Brogliatti y col., (2004) (CC: VA 1067,10 $\times 10^6$ *vs.* 789,20 $\times 10^6$ esp/ml).

Estas diferencias podrían explicarse porque la estimulación eléctrica provocada por la EE incrementa la secreción de plasma seminal por las glándulas sexuales accesorias, aumentando el volumen y por ende, disminuyendo la concentración espermática. Estos fluidos no deben recogerse al realizar esta práctica. Es también importante recordar que muchos factores pueden afectar la concentración y el volumen de las muestras seminales haciendo poco fiables estas características para la evaluación de calidad seminal (Barth, 2000).

Discusión

Tampoco hubo diferencias significativas en el porcentaje de espermatozoides móviles (VA: 76,67% *vs.* EE: 73,00%) en concordancia con lo descrito por Austin y col., (1961) (VA: 64,00% *vs.* EE: 67,00%), Jiménez Rabadán (2013) en la raza caprina Celtibérica (VA: 88,20% *vs.* EE 89,60%) y Parpanov (2000) que no encontró diferencias significativas, pero sí describió que los eyaculados extraídos por VA presentaron un 2,10% más de movilidad. Respecto a los parámetros cinéticos de movilidad analizados por el sistema CASA (estáticos, medios, lentos y rápidos) tampoco hubo diferencias ($P>0,05$), en concordancia con Brogliatti y col., (2004) y Jiménez Rabadán (2013).

Una vez descongeladas las muestras, tampoco se encontraron diferencias en la movilidad ($P>0,05$), de acuerdo con Jiménez-Rabadán (2013) en la raza ovina Manchega. Sin embargo, Parpanov (2000) obtuvo más movilidad en los eyaculados extraídos por VA, en concreto un 5,10% más, tal y como indicaron Jiménez Rabadán (2013) en la cabra Blanca Celtibérica, que sí encontraron diferencias significativas (VA: 43,40% *vs.* EE: 24,50%) achacándolo a que la EE podría influir en la cantidad secretada por las glándulas sexuales accesorias y la composición química del plasma seminal, pudiendo modificar la tolerancia del espermatozoide al proceso de criopreservación.

Con respecto al IF del espermatozoide obtenido por ambos métodos de extracción seminal no se encontraron diferencias significativas ($P>0,05$) (VA: 9,39 *vs.* EE: 8,50) en concordancia con lo descrito por Dobrinski y col., (1994), Januskauskas y col., (2001), Addad, (2009), Malama y col., (2012) que al utilizar la vagina artificial en toro señalaron valores para el IF del 7,00%, 8,00%, 8,80% y 7,08%, respectivamente.

De acuerdo con nuestro resultado, pero en ganado ovino, Jiménez-Rabadán (2013) tampoco encontró diferencias en la raza Manchega. Sin embargo, este mismo autor, si las halló diferencias, en la raza caprina Blanca Celtibérica ($N=7$) debidas al método de extracción (VA: $3,20\pm0,50$ *vs.* EE: $6,10\pm0,60$), describiendo un IF inferior en los eyaculados obtenidos por VA que lo atribuye a que la EE modificaría la composición proteica y enzimática del plasma seminal encargado de proteger al espermatozoide del estrés oxidativo, aunque también plantea que la congelabilidad podría afectar más al espermatozoide de la raza caprina Blanca Celtibérica que a otras razas y

especies de pequeños rumiantes. De hecho, Marco-Jiménez y col., (2008) describieron diferencias en la composición proteica y en la concentración de iones del plasma seminal en muestras obtenidas por VA y EE en la raza ovina Guirra, en contraposición con Jiménez-Rabadán (2013) que no las encontró para el IF en la misma especie, pero en otra raza, la Manchega.

La razón por la cual nuestros resultados no muestran diferencias significativas atribuibles al método de extracción seminal, podría estar relacionada con el hecho de que el ensayo se realizó en unas condiciones muy óptimas, comparadas con las extracciones habitualmente realizadas en campo, manteniendo siempre la temperatura interior en el tubo colector durante el proceso de extracción y realizando con rapidez el análisis posterior.

Por otra parte, la no existencia de diferencias también podría deberse a que ambos métodos comparten la misma velocidad de flujo de salida del semen por los conductos seminales y que éste se expone durante el mismo período de tiempo a las condiciones ambientales. Por tanto, en lo sustancial ambos métodos no son tan diferentes como parece.

2.2.2.- Influencia de la extracción seminal *postmórtem* en la raza de Lidia.

Sobre muestras seminales obtenidas tras la refrigeración *postmórtem* a 5 °C de los testículos sin flujo sanguíneo de toros de la raza de Lidia, durante un máximo de 12 h hasta la recolección por flujo retrógrado de los espermatozoides de las colas epididimarias, se analizó el IF junto al resto de parámetros seminales. Posteriormente, se compararon esos resultados con los obtenidos por electroeyaculación *antemortem* encontrándose diferencias significativas para los parámetros IF, volumen concentración, movilidad masal, individual, progresiva y progresiva postdescongelación.

La cola del epidídimo proporciona un medio óptimo para la supervivencia espermática durante un periodo de tiempo, si éste se alarga sin realizar la extracción, la refrigeración se considera necesaria para minimizar el daño a la integridad del espermatozoide en el toro y otras especies (Yu y Leibo, 2002 en perro; Martínez-Pastor y col., 2005 y Fernández-Santos y col., 2006 en ciervo; Martins y col., 2009 y

Malcotti y col., 2012 en toro). Se ha demostrado que el descenso progresivo de la temperatura de conservación de los testículos hasta los 5 °C, inmediatamente después de la muerte del toro, disminuye el metabolismo espermático, la pérdida de energía y aumenta la viabilidad de los espermatozoides (Martins y col., 2009). Algunos autores han almacenado los testículos de toro para saber cómo afecta a los parámetros espermáticos el paso del tiempo. En concreto, Malcotti y col., (2012) comprobaron que el almacenamiento durante 78 h a una temperatura de 5 °C, no afectó al IF ni a la viabilidad espermática, pero si a la movilidad total y Martins y col., (2009) describieron que tras 48 h a 5 °C la variable más afectada fue la movilidad progresiva de los espermatozoides en bovino. Mientras que Stout (2012), concluyó que los espermatozoides de toro epididimarios fueron más resistentes a la criopreservación que los eyaculados y presentaron mejores características seminales tales como, concentración espermática y parámetros de movilidad antes y después de la criopreservación.

Encontramos diferencias significativas entre el IF de los espermatozoides epididimarios (EP) y los procedentes de eyaculados (EY), siendo más elevado en estos últimos (2,90% *vs.* 6,46%) en concordancia con Malcotti y col. (2012) que tras mantener 30 h, las colas epididimarias sin flujo sanguíneo a 5 °C obtuvieron un IF del 4%, indicando que los EY podrían haber acusado más este problema. Del mismo modo, Fernández-Santos y col., (2006) observaron en ciervo, que el nivel de fragmentación más elevado en EY, podría derivarse de una producción elevada ROS por los propios espermatozoides junto con una reducción de la capacidad antioxidante del plasma seminal. Sin embargo, otros autores opinan que en los humanos, los EP fueron más vulnerables a la tensión oxidativa al no haber estado expuestos al plasma seminal (Chen y col., 2003; Wat-Sum y col., 2006; Aitken y de Lullis, 2010). Esta diferencias entre especies, podrían estar relacionadas con la propia estructura de la cromatina espermática, en concreto con el contenido de protaminas en el núcleo espermático, siendo el bovino una de las especies con el ADN espermático más resistente (Fortes y col., 2012).

El epidídimo secreta un conjunto de factores protectores y enzimas extracelulares antioxidantes (Wat-sum y col., 2006) y por su parte los

espermatozoides poseen su propia capacidad antioxidante (Tremellen, 2008). Sin embargo, en el eyaculado, se generan ROS, que, provocarían una bajada en su nivel de protección, y además si le sumamos que la concentración proteica del plasma seminal, pueda estar alterada, podría ser otra causa adicional del incremento del IF (Aitken y Koppers, 2011; Jiménez Rabadán, 2013).

Frente al resto de parámetros seminales se observaron diferencias significativas, excepto con las anomalías morfológicas.

El volumen obtenido del epidídimo fue significativamente inferior ($P<0,001$) (EP: 4 ml *vs.* EY: 14 ml) en concordancia con los 3,9 ml que Amann y Almquist, (1961) obtuvieron del epidídimo, en 8 toros Holslein, y con Hafez (1989) que describió un volumen de 10-15 ml de esperma eyaculado, en toro adulto. Esta diferencia era esperable dado que al eyaculado se le añade el plasma seminal.

Si nos fijamos en la concentración espermática, su resultado fue significativamente superior ($P<0,001$) en el epidídimo (EP: $1385,88 \times 10^6$ esp/ml *vs.* EY: $923,97 \times 10^6$ esp/ml) estando los resultados dentro del rango establecido de acuerdo con Amann y Almquist (1961) (1360×10^6 esp/ml) y Stout (2012) (EP: 1240×10^6 esp/ml *vs.* EY: 760×10^6 esp/ml, $N=6$) que realizaron sus estudios en los mismos toros. La concentración epididimaria obtenida fue más elevada que la señalada por Martins y col., (2009) y por Albers y Barrios (2011) (532×10^6 esp/ml) por el mismo método de obtención. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio por electroeyaculación, fueron inferiores al descrito por Hafez (1989) para toro adulto ($1,800 \times 10^6$ esp/ml). Esta diferencia podría explicarse porque son necesarias varias eyaculaciones para vaciar las reservas espermáticas del epidídimo y por otra parte, podría haber influido que el toro haya eyaculado 72 h antes de la extracción del epidídimo (Amann y Almquist, 1961, 1976), además de otras características morfológicas como el tamaño y la circunferencia escrotal que a su vez, varían con la edad.

Los parámetros de movilidad también presentaron diferencias significativas ($P<0,001$) *postmórtem vs. antemórtem* en la movilidad masal (EP: 0 *vs.* EY: 1,89), movilidad individual (EP: 60,50%, *vs.* EY: 75,05%) y movilidad progresiva (EP:

58.33% *vs.* EY: 69,66%). Concuerdan con los obtenidos en toro y otras especies (Yu y Leibo 2002 en perro; Kaabi y col., 2003 en ovino; Silva y col., 2003 en toro; Martínez-Pastor y col., 2005 en ciervo; Malcoltti y col., 2012 en toro).

Los espermatozoides de este estudio recién extraídos de las colas no tienen movilidad masal debido a que los EP se producen en el testículo y posteriormente se mezclan con los fluidos epididimarios. En esta situación permanecen inmóviles, con un metabolismo muy bajo que preserva sus reservas energéticas y disminuye los efectos perjudiciales de los agentes oxidantes endógenos derivados de la actividad mitocondrial sobre la membrana y las estructuras internas (Robaire y Viger, 1995). Pero una vez que se diluyen durante 5-10 min a 37 °C se producen los cambios necesarios para que los espermatozoides alcancen su máximo movimiento (Johnson y Everitt, 1984; Martínez-Pastor y col., 2005).

Al comparar la movilidad individual en fresco, si se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,001$), siendo inferior en el esperma de epidídimo (EP: 60,50% *vs.* EY: 75,07%), resultado de acuerdo con Martins y col., (2007) en los mismos toros (EP: 71% *vs.* EY 65%) pero no con Graham (1994) que no encontró diferencias significativas (EP: 82% *vs.* EE: 79%). El valor obtenido para los EP está dentro de la normalidad, pues otros autores (Amann y Almquist, 1961; Way y col., 2000; Reyes-Moreno y col., 2000) utilizando la misma técnica de obtención, reportaron valores de 70%, 67-75% y 96%, respectivamente.

Con respecto a la movilidad progresiva, también existieron diferencias significativas ($P < 0,001$) en fresco (EP: 58,33% *vs.* EE: 69,66%), siendo inferior la movilidad de los EP. Los resultados estuvieron dentro de la normalidad de acuerdo con Hafez (1989) (MP promedio en fresco: 67%). Sin embargo, otros estudios realizados en los mismos toros, no las hallaron, como Stout, (2012) en 4 toros de la raza Holstein (EP: 70,60% *vs.* EY; 64,40%) y Amann y Griel (1974) en 7 toros de la raza Holstein (EP: 65% *vs.* EE: 68%).

Tras la criopreservación, la movilidad individual también presentó diferencias significativas ($P < 0,05$) (EP: 32% *vs.* EY: 34%) y se observó un descenso del 28% y 41% en ambos eyaculados, afectando más a los EY. De modo coincidente, Martins y

col., (2007) describieron un descenso del 10% en los EY de un toro, con respecto a la movilidad de los EP de 3 toros de matadero.

Al analizar la movilidad progresiva postdescongelación, los EY presentaron un valor superior ($P < 0,001$) (EP: 52,86% *vs.* EY: 66,12%) de acuerdo con Stout (2012) que también obtuvo diferencias significativas (EP: 58,80% *vs.* EE: 50,90%) pero describió una movilidad mayor en los EP. Por otra parte, los resultados postdescongelación estuvieron dentro de la normalidad, coincidiendo con Cupps y Briggs (1998), para los EY (MPD: 50%-80%), y según lo reportado por Igboeli y Foote (1968), para los EP con un 41% en 5 toros. En cambio, fue superior al dato descrito por Amann y Almquist (1961) que obtuvieron un 26% ($N=35$). Se observó que la criopreservación afectó por igual y en baja medida a la movilidad progresiva de ambos tipos de espermatozoides.

En las anomalías morfológicas no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) probablemente porque la extracción por electroeyaculación conlleva más formas inmaduras, del mismo modo que algunos EP podrían no haber finalizado su maduración (Briz, 1996). Los porcentajes obtenidos en fresco (EP: 11,33% *vs.* EY: 10,45%) y postdescongelación (EP: 11,33% *vs.* EY: 10,56%) apenas variaron, y en ambos casos estuvieron dentro de la normalidad, al no superar el 30% de anomalías morfológicas señalado por Cupps y Brigg (1998) y Barth (2000), ni el 20% descrito por Henault y col., (1995) en espermatozoides de la cola del epidídimo por la posible influencia en la fertilización. Estos datos contrastan con los obtenidos por Silva y col., (2003) y Martins y col., (2009) que encontraron diferencias significativas en el porcentaje de gota citoplasmática distal. Esta discrepancia podría explicarse porque la maduración espermática se produce en el epidídimo y podría no haber finalizado todavía, obteniéndose más formas inmaduras.

Con respecto a la viabilidad espermática, teniendo en cuenta que tras la descongelación sufre una disminución aproximada del 50% por desestabilización de la membrana espermática (Thomas y col., 1998, Watson, 2000), los resultados obtenidos se encontraron dentro de la normalidad y no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$), aunque si se apreció una tendencia positiva en el espermatozoides epididimario (EP: 34,71% *vs.* EY: 23,00%) como Scout (2012), que tampoco

encontró diferencias significativas (EP: 74,20% vs. EY: 63,10%) en los mismos 4 toros Holstein.

Ha quedado demostrado en este trabajo que el esperma epididimario representa una fuente viable de esperma que se puede criopreservar, conservándose la genética de toros élite y siendo factible su diseminación. Por otra parte, representa la última posibilidad para conservar material genético si no ha podido recogerse *in vivo*, adquiriendo gran importancia en el caso particular de la raza de Lidia, ya que puede ser la única forma de conservar células fecundantes de aquellos individuos que han mostrado unas cualidades etológicas superiores durante la lidia.

2.3.- Influencia de la edad.

El objetivo de este apartado fue determinar a partir de qué edad del animal se comienzan a ver los efectos del envejecimiento en la integridad del ADN espermático y en el resto de parámetros seminales. Todos los toros analizados de la raza de Lidia y de Blanca Cacerña superaron los 2 años de edad y se agruparon en 3 grupos: jóvenes (≤ 3 años), adultos (>3 y ≤ 8 años) y viejos (>9 años). Para realizar esta clasificación se tuvo en cuenta que según Almquist (1982) los toros alcanzan la madurez sexual a partir de los 3-4 años de edad y que Valecillo (2011) concluyó que la mejor edad para determinar la calidad espermática de los toros, es a partir de los 3 años. López y col. (2007) describieron que la calidad y cantidad espermática se incrementa desde la pubertad hasta los 3 ó 4 años, momento en que alcanzan sus máximos valores, manteniéndose hasta los 7 u 8 años y luego decaer. Según otros autores (Almquist y Amann, 1976; Fuerst-Waltl y col., 2006; López y col., 2007; Mandal y col., 2010) la edad ejercería un efecto significativo sobre las características seminales.

En concordancia con estos autores, encontramos diferencias que reafirman que la edad del toro afectaría significativamente a la calidad seminal, aunque, en nuestro caso, tan solo sucedió con dos parámetros: el IF ($P \leq 0,001$) y el volumen seminal ($P \leq 0,003$) en toros RL a partir de los 9 años de edad. Sin embargo, el valor medio del resto de parámetros seminales subjetivos (CC, MM, MI, MP AM, MID, MPD, AMD, V) fue similar en los 3 grupos de edad considerados.

Asimismo, en los análisis efectuados en toros BC no hubo diferencias significativas ($P>0,05$) en ninguno de los parámetros seminales (IF, VOL, CC, CLM, MI, MID) de dos grupos de edad (jóvenes ≤ 3 años; adultos 3-8 años).

En primer lugar, no hubo diferencias entre los toros jóvenes y adultos de la RL y BC respecto al IF, pero si hubo un incremento significativo ($P\leq 0,001$) en los toros viejos de la RL, con respecto jóvenes y adultos (J: 4,41% y A: 5,27% *vs.* V: 8,04%), en concordancia con otros autores (Karabinus y col., 1990; Spano y col., 2000; Wyrobek y col., 2006; Moskovtsev y col., 2009; Karoui y col., 2012). El mismo resultado se ha observado también en otras especies ganaderas como la cabra (López-Fernández y col., 2011) y el verraco (Tsakmakidis y col., 2012). En contraposición, Addad (2009) no encontró relación entre la edad y la fragmentación de la cromatina nuclear en semen fresco de toros de la raza Nelore (2,5 años *vs.* 10 años).

Esta relación podría deberse a que los genes implicados en la función apoptótica, disminuyen su eficacia en la reparación del ADN (Moskovtsev y col., 2009), lo que indicaría que la edad deteriora el proceso de selección de las células espermáticas sanas. También podría ser debido a que con el envejecimiento se produzcan más defectos en el control de la espermatogénesis, tal como sucede en los espermatozoides humanos (Vagini y col., 2007; Schmid y col., 2007).

Por tanto, esta relación indicaría que los toros viejos podrían incrementar el riesgo de fallo reproductivo y preñeces anormales, como consecuencia de la fertilización con espermatozoides con el ADN dañado.

En segundo lugar, en la RL y en la BC también se encontraron diferencias significativas ($P\leq 0,001$) entre los toros jóvenes (<3 años) y viejos (>9 años) (6,56 ml. *vs.* 10,34 ml.) pero no con los adultos (≤ 8 años) (8,09 ml.) para el volumen seminal. En la BC sólo se analizaron jóvenes y adultos (8,80 ml. *vs.* 9,25 ml.). Las diferencias en el volumen debidas a la edad han sido confirmadas por varios autores en distintas razas (Söderquist y col, 1996, en raza Swedish; Brito y col., 2002ab, en varias razas bovinas; Mandal y col., 2010, en los toros de semen congelable de la raza Frieswall). De acuerdo con nuestros resultados pero analizando diferentes intervalos de edad, encontramos a Fuerts-Walt y col., (2006) que también obtuvieron en la raza

Simmental un volumen mayor en toros de >9 años y tampoco encontraron diferencias en los toros de entre 5 y 9 años; a Karoui (2009) que observó un aumento logarítmico hasta los 9 años de edad en la raza Holstein, y a Taylor y col., (1985) que en esa misma raza observaron un aumento del volumen hasta los 7,5 años para luego permanecer constante hasta los 9-10 años. De forma similar, Vallecillo (2011) encontró diferencias superiores en los adultos (6-8 m *vs.* 3-4 años) de la raza Marismeña, y Muiño y col., (2006) describieron en Holstein volúmenes más elevados en toros de >3 años pero no encontraron diferencias en la raza Rubia Gallega (± 3 años). Únicamente Mathevon y col., (1998) observaron un incremento hasta los 4-5 años y luego una disminución conforme aumenta la edad en la raza Holstein.

Es lógico pensar que a mayor edad, más volumen seminal, ya que la circunferencia escrotal está altamente correlacionada con el volumen testicular (Latif y col., 2009) y los toros con la circunferencia escrotal más grande suelen ser los más viejos y, por tanto, los que mayor volumen seminal podrían tener.

Por otro lado, la concentración espermática no presentó variaciones debidas a la edad ($P > 0,05$) en ninguna de las dos razas. Esto concuerda con lo señalado por Brito y col., (2002a) en varias razas bovinas (2,5 años *vs.* 6 años *vs.* 15 años), Muiño y col., (2006) en la raza Rubia Gallega y Holstein (<3 años *vs.* >3 años) y Mandal y col., (2010) en semen congelable de la raza Frieswall (<30 m *vs.* 30-77 m.). No hay acuerdo en la bibliografía, algunos autores han descrito un incremento y otros una disminución de la concentración espermática con el envejecimiento.

Entre los autores que hallaron concentraciones más elevadas con la edad destacan Vallecillo (2011) en la raza Marismeña, (6-8 m. *vs.* 18-23 m), Soderquist y col., (1996) en la raza Swedish a partir de los 1-3 años de edad y, finalmente, varios autores observaron ese aumento hasta los 2 años de edad en la raza Holstein (Taylor y col., 1995; Mathevon y col., 1998, Karoui 2009).

Sin embargo, se describió una disminución a partir de los 6,3 años (Taylor y col., 1995) o un efecto *plateau* hasta los 8 años de edad (Karoui, 2009). Fuerst-Waltl y col., (2006) obtuvieron resultados diferentes en dos Centros de Inseminación Artificial (CIA) para la raza Simmental. Mientras que en el CIA 1 la concentración del

esperma disminuyó con la edad, con un nivel óptimo a los 1,5-1,7 años; en el CIA 2, la concentración más alta fue a los 4-6 años y más baja a los 1,8 años de edad, considerando este último resultado como incoherente.

Estas diferencias son esperables por el intervalo de edad analizado, dado que aquellos toros que no han completado su crecimiento corporal ni alcanzado la madurez sexual, no presentan maduración de sus órganos genitales. Y el tamaño y peso del parénquima testicular están altamente correlacionados con el número total de células de Sertoli (Berndtson y col., 1987) y con la producción espermática (Coulter y col., 1976; Madrid y col., 1988).

Con respecto a la movilidad espermática no hubo diferencias ($P>0,05$) en semen fresco ni postdescongelación, con el envejecimiento en las dos razas. Resultado de acuerdo con otros autores que, indicaron que el efecto de la edad sobre la movilidad no fue significativa (Mathevon y col., 1998; Brito y col., 2002b; Fuerts-Walt y col., 2006; Mandal y col., 2010). Muiño y col., (2006) tampoco encontraron significación en la movilidad progresiva postdescongelación en las razas Rubia Gallega y Holstein-Friesian, pero si encontraron una mejoría en la movilidad individual en fresco en toros con >3 años de Rubia Gallega. Así mismo, Hallap y col., (2004) obtuvieron ese resultado postdescongelación en los mismos toros (11-13 m *vs.* 4 años). Vallecillo (2011) también describió que la movilidad masal mejora con la edad (6-8 m *vs.* 18-23 m) pero otros autores observaron el efecto contrario (Taylor y col., 1985; Brito y col., 2002a).

Tampoco se apreciaron diferencias ($P>0,05$) en las anomalías espermáticas en fresco y postdescongelación en las dos razas descritas, de acuerdo con otros autores como, Chandler y col., (1984), tras la descongelación de dosis de toros Holstein (15 m *vs.* 26 m), Muiño y col.,(2006), en esperma fresco (<3 años *vs.* >3 años); Mandal y col., (2010) en fresco y postdescongelación (<30 m *vs.* 30-77 m) y Mena y col., (2011) en material seminal fresco, de razas bovinas de aptitud cárnica -Angus, Simmental, Charolais, Limousin, Gelbvieh y Hereford- en 4 grupos de edad (11-13 m *vs.* 13,5-18 m *vs.* 19-26 m *vs.* >26 m). Tampoco, Söderquist y col., (1996) en dosis postdescongelación de toros de entre 14 m *vs.* 78 m y Brito (2002b) a la edad de 2,5 años *vs.* 6 años *vs.* 15 años.

Hay que puntualizar que tanto Brito y col., (2002b) como Söderquist y col., (1996), no encontraron diferencias en los defectos mayores, pero si en los menores con respecto al incremento de la edad (no se han analizado en esta investigación). Al contrario, Hallap y col., (2004, 2006) no encontraron cambios morfológicos postdescongelación a los 11-13 m y 4 años, pero si a los 7 años. Otros autores (Taylor y col., 1985; Vilakazi y Webb, 2004; Mandal y col., 2010) encontraron diferencias entre las anomalías, siendo más elevadas en toros jóvenes que en adultos.

Para la viabilidad espermática postdescongelación, tampoco se observaron diferencias significativas ($P>0,05$) en los toros de la RL (no se analizó este parámetro en la BC), al igual que Vallecillo (2011). Al contrario, Fuerts-Walt y col., (2004) en el CIA 1 encontraron menos espermatozoides viables con la edad, presentando los toros más viejos valores medios, mientras que en el CIA 2, las diferencias entre los grupos de edad fueron pequeñas correspondiendo los valores más bajos a los toros más viejos. En contraposición, otros autores reportaron que la edad afectó de una forma significativa y positiva a la viabilidad espermática (Söderquist y col., 1991; Brito y col., 2002b, Mandal y col., 2010).

A pesar de la variabilidad de resultados encontrada en la bibliografía sobre el efecto de la edad en las características seminales, hay que resaltar que las peculiaridades que presentan la RL y BC, darían más validez a los resultados obtenidos. Se emplearon toros no aprobados ni testados para la comercialización de sus dosis seminales, mientras que los toros de CIA considerados no aptos o aquellos que fueron aprobados, pero poco solicitados, nunca habrán formado parte de los grupos de toros de edad más avanzada. También el factor raza, podría haber influido en las diferencias espermáticas al existir, diferencias genéticas en la calidad del semen (Hoflack y col., 2007) y los rangos de edad analizados, debido a la poca variabilidad en el margen de edad entre los toros de algunos estudios. También podrían afectar a los índices espermáticos, diferencias individuales como, el nivel de actividad de las gónadas, perímetro testicular, tamaño, peso del individuo, la alimentación e incluso las condiciones climatológicas (Graves, 1978; Al-Hakim y col., 1986; Sharma y col., 1991).

3.- DINÁMICA DE FRAGMENTACIÓN DEL ADN ESPERMÁTICO BOVINO.

Los estudios sobre fragmentación del ADN espermático se limitan, en muchos casos, a la fragmentación que presenta el individuo en el momento exacto de la eyaculación.

Sin embargo, un factor poco estudiado es la resistencia de los espermatozoides cuando se incuban a lo largo del tiempo a una determinada temperatura. Esta información es importante conocerla, pues, dos individuos pueden presentar idéntico nivel de fragmentación basal, pero diferente comportamiento en este parámetro con el paso del tiempo.

En este apartado se analizó el IF del eyaculado postdescongelación tras la incubación en condiciones experimentales de las dosis seminales a temperatura ambiente (22 °C) y a la temperatura fisiológica de la hembra (38,6 °C), tanto en toros de la raza de Lidia como Blanca Cacerreña. Los tiempos de incubación se realizaron desde el momento de la descongelación (0h) y tras 4 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 192 h, 216 h, hasta las 240 h de incubación.

3.1.- Efecto de la temperatura sobre la dinámica de fragmentación del ADN espermático bovino.

Se observaron diferencias significativas ($P \leq 0,001$) para el IF debidas a la temperatura de incubación. Los resultados indicaron que la resistencia del ADN espermático postdescongelación en condiciones *in vitro*, fue mayor a una temperatura de 22 °C. En concreto, el grupo mayoritario de dosis, alcanzaron niveles críticos de IF a 38,6 °C, entre las 48 h-72 h (N=41), mientras que a 22 °C sucedió más tarde, a las 72 h-96 h (N=45). Estos resultados están en concordancia con Gosálvez y col., (2008) que indicaron, una fragmentación baja del ADN en toro, durante las primeras 4 h de incubación a 37 °C y con estos mismos autores que en dosis de toro de Lidia (N=4), observaron que el IF se disparaba transcurridas 48 h a 37 °C (Gosálvez y col., 2011c). También Karoui y col., (2012) en vacuno Holstein, describieron que tras 6h de incubación a 37 °C no hubo diferencias en el IF. Sin embargo, Waterhouse y col., (2010), en las razas Holstein y Norwegian Red, encontraron un incremento rápido

del IF durante las primeras 9 h de incubación utilizando dos diluyentes diferentes, sin dar explicación al respecto. Otros autores, concluyeron que, a temperatura ambiente, la fertilidad del esperma se conservaría en unas tasas aceptables durante los primeros 3-5 días, pero tras ese período la fertilidad disminuía entre un 3% y 6% por día (Vishwanath y Shannon, 2000; Gosálvez y col., 2008; Gosálvez y col., 2011c), lo cual indica que para preservar el esperma sin que este parámetro se incremente, es necesario disminuir la temperatura y ralentizar el metabolismo espermático.

También observamos, a las dos temperaturas, un incremento progresivo de la inestabilidad del ADN en el núcleo espermático desde el comienzo del experimento, hasta que se degradó por completo. Eso sí, presentando una elevada variabilidad inter individual. Este hecho se comprobó en algunas dosis seminales, donde rápidamente se observaron daños en su ADN ($IF \geq 20\%$) tras un periodo muy breve de incubación (4 h), mientras que otras resistían mejor el paso de las horas. Destacar que 2 dosis seminales pertenecientes a dos eyaculados del mismo individuo, sin información sobre la fecha de extracción, no se degradaron tras 240 h de incubación, manteniendo el mismo nivel de IF desde el inicio y con un comportamiento muy similar a las dos temperaturas.

En concordancia con otros estudios, se ha observado que con el paso del tiempo las muestras tienden a ir aumentando el IF desde el momento de su descongelación, tanto en toro (Karabinus y col., 1990, 1991, 1997; Boe-Hansen y col., 2005; Gosálvez y col., 2007, 2008, 2011b), como en caballo (López-Fernández y col., 2007), morueco (López-Fernández y col., 2008), verraco (Pérez-Llano y col., 2010), humana (Gosálvez y col., 2009; García-Peiro y col., 2011), varias especies de mamíferos (Gosálvez y col., 2011c) y especies salvajes, como el rinoceronte (Portas y col., 2009), el koala (Zee y col., 2009) y los ciprínidos *Tinca tinca* (López-Fernández y col., 2009). De hecho, no se conocen estudios que hayan descrito lo contrario.

Al comparar los resultados de velocidad de degradación del ADN espermático del toro a la temperatura de incubación del tracto genital de la hembra, se observa que es similar a la del verraco, que puede llegar a retrasarse hasta 5 días (Pérez-Llano y col., 2010). Sin embargo, en los ciprínidos, la degradación es casi total tras 1 h de incubación (López-Fernández y col., 2009), seguido del morueco, que con 4 h de

incubación sufre una fragmentación máxima (Gosálvez y col., 2007, 2008; López-Fernández y col., 2008a, 2010) y del caballo y el ser humano, que llegaron a doblar el nivel basal del IF en tan solo 5 h (López Fernández y col., 2007; Gosálvez y col., 2009).

Estas diferencias entre especies puede estar relacionado con el contenido de protaminas en el esperma nuclear. En el toro y el verraco está presente el gen codificante para la P2 pero parece ser disfuncional o producir una proteína aberrante (Balhorn, 2007; Gosálvez y col., 2011c) y éstas dos especies son las que presentan espermatozoides con más resistencia al daño espermático. Quizá la no presencia de P2 podría ser la causa responsable de una cromatina espermática más estable. Concretamente en bovino, el IF fue correlacionado positivamente ($P<0,05$) con el porcentaje de espermatozoides que mostraron un contenido bajo en protaminas y negativamente ($P<0,05$) con el tamaño de la circunferencia escrotal, de manera que cuanto mayor fue ésta, el esperma mostró más contenido en protaminas y menos daño en el ADN espermático (Fortes y col., 2012). Por tanto, parece que la deficiencia en protaminas en el esperma es uno de los factores que contribuyen al daño e inestabilidad del ADN espermático de bovino

Desde un punto de vista biológico, conocer la dinámica de fragmentación de una muestra es muy importante. En humana, una dosis seminal utilizada para IA o FIV, podría tener elevados niveles de IF en el momento de la fertilización, si ha transcurrido cierto tiempo desde la eyaculación. En los programas de reproducción asistida en humanos, en concreto con la técnica FIV, los oocitos son expuestos al esperma un máximo de 20 h. En algunos casos, este período de co-incubación, produce problemas en el desarrollo normal del embrión, mientras que una co-incubación ultracorta mejora los niveles de fertilización mediante FIV (Bungum y col., 2006).

Se recomendaría estudiar más a fondo la dinámica de fragmentación del ADN de las dosis seminales para conocer mejor la resistencia del ADN nuclear en el tiempo, sobretodo, antes de utilizarla en la práctica clínica (Gosálvez y col., 2008; 2011b; Karoui y col., 2012).

Una vez que descongelamos las dosis, es aconsejable su rápida utilización dado que la degradación del ADN se inicia en ese mismo instante y cualquier retraso podría ejercer una influencia negativa sobre su capacidad de fertilización (Gosálvez y col., 2008). También es importante preservar el semen a baja temperatura para reducir el metabolismo espermático y así prolongar la vida fértil de los espermatozoides, evitando fallos reproductivos en las técnicas de reproducción asistida.

Conocer la velocidad de degradación del ADN espermático de las dosis seminales serviría para emplear solamente las pertenecientes a donantes con mayor estabilidad temporal de su ADN en la IA o FIV. No se recomienda el uso de dosis seminales de individuos o eyaculados que presenten altos niveles de IF antes de las 48 h de incubación a 38,6 °C porque ello significaría un aumento agudo del IF en el tracto genital de la hembra en el momento de la fertilización, disminuyendo sus posibilidades de éxito para conseguir embriones viables.

3.1.1.-Efecto de la extracción seminal *postmórtem* sobre la dinámica de fragmentación del ADN en la raza de Lidia.

Si las cualidades etológicas del toro lidiado en la plaza han sido óptimas, lo más probable es que el ganadero recoja *postmórtem* sus testículos en el desolladero, se refrigieren a 5 °C y así se trasladen hasta el laboratorio donde se realizará la extracción seminal para su criopreservación. Por ello se consideró el estudio de la dinámica de fragmentación del ADN, durante 96 h de incubación a 38,6 °C y 22 °C, y así conocer el patrón del comportamiento del ADN espermático en estas dosis observándose diferencias significativas ($P < 0,001$) en función de la temperatura de incubación.

El nivel basal del IF basal en estas muestras, es bajo al inicio del experimento (IF=2,9%), de acuerdo con estudios realizados en otras especies (Anel- López y col., 2012). El epitelio epididimal de la cola del epidídimo es capaz de proteger al espermatozoide del estrés oxidativo y favorecer la supervivencia y movilidad tras la descongelación *in vitro* (Reyes Moreno y col., 2002). Además, Martins y col., (2007) demostraron el mantenimiento de la capacidad fertilizadora de los espermatozoides epididimales de toro, criopreservados rápidamente, tras la muerte del animal.

Sin embargo, con respecto a la dinámica del IF, en estas dosis, se disparó tras 4 h de incubación (IF=20,43%) a 38,6 °C, superando el umbral crítico de fragmentación. En cambio, a 22 °C fue posterior, al no alcanzar este umbral hasta las 24 h (IF=22,23%).

Estas diferencias indican que las dosis seminales extraídas *postmórtem* sufrirían una velocidad de degradación del ADN espermático más acusada en el tracto genital de la hembra, con lo cual, dispondrían de menos tiempo para alcanzar el oocito. Esto revela la importancia de la temperatura y el tiempo en el manejo de las dosis seminales postdescongelación para conseguir una IA exitosa en ganado bovino.

Sin embargo, en otras especies como el ciervo común *Cervus elaphus hispanicus* (N=9) Anel-López y col., (2012) obtuvieron un incremento moderado del IF, con una media del 11,70% en 6 h a 39 °C, señalando autores de este mismo grupo (Fernández-Santos y col., 2009) que el ADN de estas muestras fue resistente al almacenamiento sin antioxidantes, permaneciendo con niveles bajos de IF tras la incubación.

La supervivencia del almacenaje espermático en el epidídimo del toro guarda relación con la secreción de proteínas epididimales que mantienen la movilidad *in vitro*. (Reyes-Moreno y col., 2002). Poco se conoce de las secreciones epididimales y de los mecanismos moleculares que permiten preservar la funcionalidad y viabilidad espermática. Hasta el momento, los mecanismos propuestos que regularían la protección del espermatozoide en la cola del epidídimo implican a los inhibidores de los factores de complemento, enzimas que actúan produciendo la lisis celular (Reyes-Moreno y col., 2002), participan en el metabolismo y conjugación del glutatión que proporciona protección contra el daño oxidativo (Agarwal y col., 2003; Zubkova y Robaire, 2004), y regulan la actividad proteolítica espermática de la serin- y cistein-proteasas, que pueden inhibir y proteger la membrana espermática de una degradación proteolítica inadecuada (Fouchecourt y col., 2000).

Como estas muestras no han circulado por los conductos del epidídimo no contienen los fluidos espermáticos que allí se les añaden y que, entre otros componentes, contienen los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos que hacen

frente a la tensión oxidativa. Por tanto, éstos no actuarían frente al ROS intracelular y el ADN espermático se dañaría más fácilmente. Esta afirmación concuerda con los autores que señalan que los espermatozoides epididimarios son más vulnerables en el ambiente uterino (Chen y col., 2003; Wai-Sum y col., 2006; Aitken y de Lullis, 2010; Domínguez-Rebolledo, 2011) y podría ser la razón del acusado incremento de los niveles de IF durante la dinámica realizada simulando las condiciones de temperatura del tracto genital de la hembra.

3.2.- Variabilidad individual en la dinámica de fragmentación del ADN espermático de la raza de Lidia.

Se observó que las dosis seminales de toros diferentes presentan diferencias significativas ($P < 0,001$) en la dinámica de fragmentación del ADN espermático, lo cual indica que algunas dosis seminales son más tolerantes que otras al daño de su ADN espermático y que, por tanto, la dinámica es distinta para cada individuo inclusive dentro de su misma especie.

Este resultado concuerda con Karoui y col., (2011, 2012) que encontraron una variabilidad individual muy elevada en el ratio de IF e indicaron que podría ser una característica heredable de cada individuo. Al contrario, Boe-Hansen y col., (2005) no hallaron diferencias en 3 muestras seminales congeladas procedentes de toros de la raza Holstein-Frisian, tras realizar varios análisis hasta los 25 min, pero esto podría explicarse porque los periodos de tiempo analizados fueron muy cortos, y el semen de toro posee una elevada resistencia a la fragmentación del ADN espermático durante las primeras 4 h de incubación (Gosálvez y col., 2008).

Esta variabilidad en la dinámica de fragmentación del ADN podría asociarse a diferencias inherentes a los procesos bioquímicos y metabólicos de la célula espermática (Loomis y Graham, 2008), la endogamia (Baccetti y col., 2001 en humano; Ruiz-López y col., 2010 en gacela), las características genéticas y el entorno de cada individuo (Karoui y col., 2012), y la composición en ácidos grasos poliinsaturados de la membrana plasmática del espermatozoide que se relaciona con la susceptibilidad o resistencia al estrés oxidativo (Waterhouse y col., 2006, 2010, en bovino; Domínguez-Rebolledo, 2010, en ciervo).

Nuestros resultados también están en consonancia con los descritos por otros autores en otras especies (Pérez-Llano y col., 2010 en cerdo; López-Fernández y col., 2007 en caballo; Gosálvez y col., 2007 en varias especies de mamíferos; López-Fernández y col., 2008a en carnero; López-Fernández y col., 2009 en tenca). También se han descrito estas diferencias en situaciones estresantes como el sexado del semen (Gosálvez y col., 2011b) y en la presencia de contaminación bacteriana en el espermatozoide de toro (González-Marín y col., 2011).

Por tanto, y de acuerdo con los resultados obtenidos, se constata que la dinámica del IF en términos de velocidad de degradación de ADN, difiere entre individuos de la misma raza dentro de la especie bovina, siendo esta información de gran importancia.

Mientras que muchas muestras podrían ser poco vulnerables a la incubación, como parecen confirmar los resultados de este trabajo, es posible que una parte de las muestras de toro pudiesen ser más vulnerables. Por lo tanto, los protocolos estándares de las técnicas de reproducción asistida fracasarían en cuanto a la funcionalidad de esos espermatozoides.

3.2.1.- Estudio comparativo de dosis seminales procedentes del mismo eyaculado.

Tras analizar varias dosis seminales del mismo eyaculado del toro de Lidia (N=5) no se hallaron diferencias significativas en la dinámica de fragmentación del ADN entre las muestras, como era esperable, pero sí se observó una repetibilidad en las medidas del IF desde el inicio hasta las 96 h de incubación a 38,6 °C.

Estos resultados coinciden con otros estudios realizados en toros domésticos que demostraron la existencia de una larga repetibilidad de las medidas tras 6h de incubación a 37°C de los mismos individuos (N=201), incluso asociado a, la aparición de contaminación bacteriana en las muestras de semen (González-Marín y col., 2011; Karoui y col., 2012). Esta repetibilidad de resultados demostraría que el IF podría ser una medida constante en dosis distintas obtenidas del mismo eyaculado, convirtiéndose en un valioso marcador tras comprobar su fertilidad, para ser utilizadas con técnicas de reproducción asistida.

Nuestros resultados están de acuerdo con Karoui y col., (2012) que, además de la baja variabilidad del IF, encontraron correlación con el éxito en IA advirtiendo su utilidad como medida predictiva para clasificar los individuos por su alta o baja fertilidad.

La relación del toro con la fertilidad en IA y el hecho que las medidas de IF sean repetibles hace de la dinámica del IF un marcador valioso de fertilidad en el toro. Por tanto será importante confirmar la dinámica de IF de cada eyaculado dentro del intervalo de tiempo que el espermatozoide necesita para alcanzar el óvulo (Gosálvez y col., 2008) para deducir su impacto sobre la fertilidad.

3.2.2.- Estudio comparativo de dosis seminales procedentes de eyaculados diferentes del mismo semental.

Como parece que la dinámica de fragmentación del ADN espermático es una característica inherente al individuo, se analizaron varios eyaculados del mismo individuo de la raza de Lidia (N=7) extraídos en épocas diferentes (con una diferencia mínima de 2 meses entre cada eyaculación) para evaluar dicho efecto.

Se observaron diferencias significativas ($P < 0,001$) en la dinámica de fragmentación del ADN espermático de cada eyaculado. Los resultados obtenidos por López-Fernández y col., (2011) en macho cabrío, indican que existen diferencias en cuanto a las dinámicas de fragmentación del ADN espermático en función de la latitud, las condiciones de cría y la época del año. En contraposición, Karoui y col., (2012), encontraron un efecto minúsculo de la época de extracción, que podría deberse a que las extracciones se realizaron en un CIA con óptimas condiciones ambientales.

Las diferencias encontradas en este trabajo pueden ser debidas a que influyesen sobre el toro factores externos que pudieran perturbar su estado físico y pasasen desapercibidos para los técnicos el día de la extracción, como infecciones bacterianas o víricas, episodios febriles, aumento de la temperatura ambiental, estrés, contaminación microbiana de las células germinales (Karabinus y col., 1997; Sakkas y col., 1999; Ahmadi y N. Sg., 1999; Sharma y col., 2004; Gallegos y col., 2008; González-Marín y col., 2011), la latitud, las condiciones de cría, posibles influencias

estacionales (López-Fernández y col., 2011), o la exposición a toxinas de origen diverso (García-Contreras y col., 2011). Además, también podrían influir otros factores como la alimentación, la condición corporal, la contaminación, etc., que podrían alterar la capacidad de los espermatozoides para soportar el estrés oxidativo, al inducir cambios en la composición de la membrana, en la disponibilidad de antioxidantes intracelulares o en la acción de factores dependientes de la espermatogénesis, ocasionando fallos en la sustitución de las histonas-protaminas o en la maduración espermática (por ejemplo, susceptibilidad a la activación de vías apoptóticas o nucleasas), finalizando en un proceso erróneo de condensación de la cromatina espermática (Sakkas y col., 1999; Anzar y col., 2002; Agarwal y col., 2008; Aitken y De Iuliis, 2010).

Todo lo apuntado anteriormente, recalca la importancia de realizar un examen físico exhaustivo al semental antes de la extracción seminal, y luego realizar ésta con las mejores condiciones de temperatura y de higiene posibles. Además, convendría analizar la dinámica del IF de cada eyaculado individual, pues es una característica inherente al animal como ha quedado patente.

3.3.- Estudio comparativo de dosis seminales extraídas por vagina artificial y por electroeyaculación.

No se encontraron diferencias significativas en la dinámica de fragmentación del ADN espermático en los eyaculados extraídos por VA y EE al mismo individuo ($P>0,05$). No hay estudios a este respecto, únicamente los resultados del IF de Jiménez-Rabadán, (2013) que no halló diferencias en ovino, pero si las observó entre la VA y la EE en caprino, atribuyéndolo a la posible variación en la composición del plasma seminal, pero no realizó la dinámica de fragmentación del ADN.

Como ya se ha comentado, en ambos métodos, el espermatozoide es eyaculado por los conductos seminales a la misma velocidad y se expone al plasma seminal del mismo modo. Es conocido que tras la eyaculación, los metabolitos generados por las especies reactivas de oxígeno (ROS) durante los procesos oxidantes influyen sobre la fusión espermatozoide-ovocito, la movilidad espermática y la integridad del ADN (Aitken y col., 1998). Para contrarrestar estos efectos, el plasma seminal contiene

Discusión

enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa) y otros compuestos antioxidantes (ascorbato, urato, α -tocoferol, piruvato, glutatión, taurina e hipotaurina (Finguerova y col., 2007), así como albúmina, carnitina, carotenoides y flavonoides (Tremellen, 2008). Por tanto, los eyaculados recibirían la misma protección antioxidante del plasma seminal y ello explicaría porqué la dinámica de fragmentación del ADN presenta la misma resistencia a la incubación a 38,6°C independientemente de la técnica de extracción empleada.

CONCLUSIONES

1. El Test de Dispersión de la Cromatina Espermática (SCD) es una técnica rápida, económica y de fácil aplicación e interpretación que debería incorporarse a la rutina laboratorial como apoyo al seminograma básico realizado en el ganado vacuno en general, y en el vacuno extensivo, en particular.
2. El índice de fragmentación medio del ADN espermático en el ganado bovino fue del 8,08% y tan solo un 4,70% del total de muestras criopreservadas analizadas presentaron niveles elevados ($IF \geq 20\%$) de fragmentación del ADN.
3. La movilidad masal, anomalías morfológicas y viabilidad postdescongelación se han correlacionado con el IF pero podrían no ser concomitantes, lo que indicaría que el IF es un parámetro independiente del seminograma clásico de calidad seminal.
4. La raza influye sobre este índice, obteniéndose para la raza de Lidia un IF medio del 6,05% y para la Blanca Cacerña de un 13,97%. En el resto de parámetros espermáticos, se observaron diferencias debidas a la raza en el volumen y en las anomalías morfológicas postdescongelación.
5. En cuanto a la edad de los individuos, a partir de los 9 años de edad, el volumen seminal y el IF se incrementan significativamente, mientras que el resto de parámetros no presentan diferencias.
6. La recogida *postmórtem* por flujo retrógado mostró buenas características de calidad seminal, influyendo en dos parámetros, volumen seminal y el IF, con respecto, a la electroeyaculación y vagina artificial, entre las que no se encontraron diferencias.
7. La dinámica de fragmentación del ADN espermático de muestras seminales criopreservadas varió en función de la temperatura de incubación, siendo más rápida a temperatura del tracto genital de la hembra con un límite de resistencia del ADN de 48 h, mientras que en las obtenidas *postmórtem* fue de 24 h. Además, presentaron una elevada variabilidad inter e intra-individual en

eyaculados diferentes, mientras que no hubo diferencias entre las de un mismo eyaculado.

8. Las dosis seminales criopreservadas, obtenidas por electroeyaculación y vagina artificial al mismo toro, no mostraron diferencias en la dinámica de fragmentación del ADN espermático, siendo similares en la raza Blanca Cacerreña.

BIBLIOGRAFÍA

Abad, C., Amengual, M.J., Gosálvez, J., Coward, K., Hannaoui, N., Benet, J., García-Peiró, A., Prats, J. (2013). Effects of oral antioxidant treatment upon the dynamics of human sperm DNA fragmentation and subpopulations of sperm with highly degraded DNA. *Andrología*; 45:211-216.

Acevedo, N. (2001). Effects of scrotal insulation on spermatozoal morphology and chromatin stability to acid denaturation in the bovine. Thesis doctoral. Blacksburg (Va): Virginia Polytechnic Institute and State University. EEUU.

Acosta, M., Sanz, J., Rodríguez, I. (1991). Aportaciones a la recogida de material seminal en el ganado vacuno bravo. VI Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e Inseminación Artificial, Salamanca, Castilla y León. 152-155.

Addad, R.O., Freneau G.D., Cardoso, L., Marcal, L. (2009). Avaliação clínico-andrológica em touros Nelore e testes de viabilidade espermática, integridade de acrossoma e fragmentação de cromatina ao longo de três estações reprodutivas. *Ciencia Animal brasileira*; 10: 1044-1054.

Agarwal, A., Allamaneni, S. (2004). The effect of sperm DNA damage on assisted reproduction outcomes. *Review Minerva Ginecol.*; 56(3):235-245.

Agarwal, A., Saleh, R.A., Bedaiwy, M.A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.*; 79:829-843.

Agarwal, A., Makker, K., Sharma, R. (2008). Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *An. J. Reprod. Immunol.*; 59:2-11.

Ahmadi, A., Ng, S. (1999). Fertilizing ability of DNA-Damaged Spermatozoa. *J. Exp. Zool.*; 284:696-704.

Aitken, R.J., De, Iuliis, G.N. (2010). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Mol. Hum. Reprod.*; 16:3-13.

Aitken, R.J., De, Iuliis G.N., McLachlan, R.I. (2009). Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. *Int. J. Androl.*; 32: 46-56.

Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J.P., Milne, P., Jennings, Z., Irvine, D.S. (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*; 59:1037-1046.

Aitken, R.J., Koppers, A.J. (2011). Apoptosis and DNA damage in human spermatozoa. *Asian J. Androl.*; 13:36-42.

Aitken, R.J., Jones, K.T., Robertson, S.A. (2012). Reactive oxygen species and sperm function - In sickness and in health. *J. Androl.*; 33(6):1096-1106.

Aitken, R.J., Buckingham, D., West, K., Wu, F.C., Zikopoulos, K., Richardson, D.W. (1992). Differential contribution of leukocytes and spermatozoa to the high levels of reactive oxygen species recorded in the ejaculates of oligozoospermic patients. *J. Reprod. Fertil.*; 94:451-462.

Aitken, R.J., Fisher, H.M., Fulton, N., Gómez, E., Knox, W., Lewis, B., Irvine, S. (1997). Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol. Reprod. Dev.*; 47(4): 468-482.

Aitken, R.J., Krausz, C. (2001). Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*; 122:497-506.

Al-Hakim, M. K., Ali, S. B. A., Singh, B. P. (1986). Studies on semen characteristics of Karadi bulls. *Animal Breeding Abstracts*; 54:155.

Albers, M.I., Barrios, D.R. (2011). Concentración y morfología de los espermatozoides epididimarios obtenidos de toros postmortem. *Rev. Fac. Cienc. Vet.*; 52(2):091-098.

Allamaneni, S.S., Naughton, C.K., Sharma, R.K., Thomas, A.J. Jr., Agarwal, A. (2004). Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size. *Fertil. Steril.*; 82:1684-1686.

Almquist, J. O. (1982). Effect of long term ejaculation at high frequency on output of sperm, sexual behavior, and fertility of Holstein bulls; relation of reproductive capacity to high nutrient allowance. *J. Dairy Sci.*; 65(5):814-823.

Almquist, J.O., Amann, R.P. (1976). Reproductive Capacity of Dairy Bulls. Part XI. Puberal characteristic and postpuberal change in production on semen and sexual activity of Holstein bull ejaculated frequently. *J. Dairy Sci.*; 59: 986-991

Alvarez, C., Castilla, J.A., Martínez, L., Ramírez, J.P., Vergara, F., Gaforio, J.J. (2003). Biological variation of seminal parameters in healthy subjects. *Hum. Reprod.*; 18(10):2082-2088.

Amann, R.P. (1981). A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J Androl.*; 2:37-58.

Amann, R.P. (1993). Physiology and endocrinology in equine reproduction. Ed. McKinnon and Voss. Lea and Febiger, Philadelphia, EEUU. 658-658.

Amann, R.P., Almquist, J.O. (1961). Reproductive capacity of dairy bulls I. Technique for direct measurement of gonadal and extra-gonadal sperm reserves. I. *J. Dairy Sci.*; 44: 1537-1543.

Amann, R.P., Almquist, J.O. (1976). Bull management to maximize semen output. In: *Proc. 6th NAAB Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod.*; 1-15

Amann, R.P., Griel Jr, L.C. (1974). Fertility of bovine spermatozoa from rete testis, cauda epididymidis, and ejaculated semen. *J. Dairy Sci.*; 57(2):212-219.

Amann, R.P., Schanbacher, B. (1983). Physiology of male reproduction. J. Anim. Sci.; 57(2):380-403.

Ambroña, J. (1985). Raza Blanca Cacerña. Ed. Diputación Provincial de Cáceres. Comisión de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente. Extremadura .87

Anel, L., Gerra, C., Alvarez, M., Anel, E., Martínez, A.F., Boixo, C.J., Kaabi, M., Herraiz, P., Paz, P. (2002). Effect of postmortem interval in quality of epididymal spermatozoa in Iberian Red Deer (*Cervus Elaphus Hispanicus*). Theriogenology; 57:577.

Anel-López, L., Álvarez-Rodríguez, M., García-Álvarez, O., Álvarez, M., Maroto-Morales, A., Luis Anel, L., de Paz, P., Julián-Garde, J., Martínez-Pastor, F. (2012). Reduced glutathione and Trolox (vitamin E) as extender supplements in cryopreservation of red deer epididymal spermatozoa. Anim. Repr. Sci.; 135(1):37-46.

Aoki, V. W., Moskovtsev, S. I., Willis, J., Liu, L., Mullen, J. B. M., Carrell, D. T. (2005). DNA Integrity Is Compromised in Protamine Deficient Human Sperm. J. Androl.; 26(6):741-748.

Anzar, M., He, L., Buhr, M., Kroetsch, T., Pauls, K. (2002). Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. Biol. Reprod.; 66: 354-360.

Aravindan, G., Bjordahl, J., Jost, L., Evenson, D. (1997). Susceptibility of human sperm to in situ DNA desaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by single-cell electrophoresis. Exp Cell Res.; 236(1):231- 237.

Ardon, F., Helms, D., Sahin, E., Bollwein, H., Topfer-Petersen, E., Waberski, D. (2008). Chromatin-unstable boar spermatozoa have little chance of reaching oocytes in vivo. Reproduction; 135:461-470.

Arriola, J. (1995). Nuevas tecnologías reproductivas en el ganado de lidia. *Rev. Bovis* n° 62 Febrero.

Arriola, J., Yañez, B., Villareal, P. (1989). Respuesta del toro de lidia a la electroeyaculación. 4º Jornadas Internacionales de Reproducción Animal e I.A., León. Castilla y León. 211-213.

Ausió, J., Eirín-López, J.M., Frehlick, L.J. (2007). Evolution of vertebrate chromosomal sperm proteins: implications for fertility and sperm competition. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.*; 65:63-79.

Austin, J.W., Hupp, E.W., Murphree, R.L. (1961). Comparison of quality of bull semen collected in the artificial vagina and by electroejaculation. *J. Dairy Sci.*; 44(12):2292-2297.

Baccetti, B., Capitani, S., Collodel, G., Di Cairano, G., Gambera, L., Moretti, E., Piomboni, P. (2001). Genetic sperm defects and consanguinity. *Hum. Reprod.*; 16(7):1365-71.

Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.*; 8:227.

Balhorn, R., Gledhill, B.L., Wyrobek, A.J. (1977). Mouse sperm chromatin proteins: quantitative isolation and partial characterization. *Biochemistry*; 16:4074-4080.

Balhorn, R., Corzett, M., Brewer, L. (2000). DNA Condensation by protamine and arginine-rich peptides: analysis of toroid stability using single DNA molecules. *Mol. Reprod. Dev.*; 56:230-234.

Ballachey, B., Hohenboken, W., Evenson, D. (1987). Heterogeneity of sperm nuclear chromatin structure and its relationship to bull fertility. *Biol. Reprod.*; 36:915-925.

- Ballachey, B., Evenson, D., Saacke, R. (1988).** The sperm chromatin structure assay relationship with alternative tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. *J. Androl.*; 9:109-115.
- Barrios, A. (2002).** Evaluación de la calidad y capacidad fecundante de espermatozoides de la cola del epidídimo de toros post-mortem. IX Congreso Venezolano de Producción e Industria Animal. Valera, Venezuela.
- Barth, A.D. (2000).** Bull breeding soundness evaluation manual. 2^a Ed. The Western Canadian Association of Bovine Practitioners. .75.
- Barth, A.D., Oko, J. (1989).** Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Iowa State University Press, Ames. EEUU. 285.
- Bartolomé, G.P., García, B.L. (1998).** Raza Blanca Cacereña: Programa de Conservación. *Arch. Zootec.*; 47:371-380.
- Belletti, M.E., Costa, L., Mendes, M. (2005).** Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Braz J Morphol Sci*; 22:85-90.
- Bello, H.A. (2006).** Los Toros en el S. XVIII. Ed. Diputación de Salamanca. 152
- Belletti, M.E., Mello, M.L. (2004).** Comparison between the Toluidine blue stain and the Feulgen reaction for evaluation of rabbit sperm chromatin condensation and their relationship with sperm morphology. *Theriogenology*; 62:398-402.
- Bellve, A., Anderson, E., Hanley, Bowdoin, L. (1975).** Synthesis and amino acid composition of basics proteins in mammalian sperm nuclei. *Dev. Biol.*; 47:349-365.
- Bennetts, L.E., de Iuliis, G.N., Nixon, B., Kime, M., Zelski, K., McVicar, C.M., Lewis, S.E., Aitken, R.J. (2008).** Impact of estrogenic compounds on DNA

integrity in human spermatozoa: Evidence for cross-linking and redox cycling activities. *Mutat. Res.*; 641:1-11.

Berndtson, W., Igboeli, G., Pickett, B. (1987). Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young bulls. *J. Anim. Sci.*; 64:241-246.

Bianchi, P., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, U., Sakkas, D. (1993). Effect of deoxyribonucleic acid protamination on fluorochrome staining and In Situ Nick-Translation of murine and human mature spermatozoa. *Biol. Reprod.*; 49:1083-1088.

Biegeleisen, K. (2006). The probable structure of the protamine-DNA Complex. *J. Theor Biol*; 241:533-40.

Blom, E., (1983). Pathological conditions in the genital organs and in the semen as grounds for rejection of breeding bulls for import and export to or from Denmark. *Nordisk Veterinaermedicin*; 35:05-130.

Bochenek, M., Smorag Z., Pilch J. (2001). Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. *Theriogenology*; 56:557-567.

Boe-Hansen, G. B., Ersboll, A. K., Greve, T. y Christensen, P. (2005). Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. *Theriogenology*; 63:2006-2019.

Bordignon, V., Smith, L. (1999). Ultraviolet-irradiated spermatozoa activate oocytes but arrest preimplantation Development after fertilization and nuclear transplantation in cattle. *Biol. Reprod.*; 61:1513-1520.

Borini, A.; Tarozzi, N.; Bizzaro, D.; Bonu, M.A.; Fava, L.; Flamigni, C.; Coticchio, G. (2006). Sperm DNA fragmentation: Paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum. Reprod.*; 21:2876-2881.

Boyers, S., Davis R., Katz D. (1989). Automated semen analysis. *Curr. Probl. Obstet. Gynecol. Fertil.*; 12:172-200.

Brewer, L., Corzett, M., Balhorn, R. (1999). Protamine-Induced condensation and decondensation of the same DNA molecule. *Sci.*; 286:120-123.

Brewer, L., Corzett, M., Balhorn, R. (2002). Condensation of DNA by spermatid basic nuclear proteins. *J. Biol. Chem.*; 277:38895-38900.

Brewer, L., Corzett, M., Lau, E., Balhorn, R. (2003). Dynamics of protamine 1 binding to single DNA molecules. *J. Biol. Chem.*; 278:42403-42408.

Brito, L.F.C., Silva, A.E.D.F., Rodrigues, L.H., Vieira, F.V., Deragon, L.A.G., Kastelic, J.P. (2002a). Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. *Theriogenology*; 58(6):1175-1186.

Brito, L.F.C., Silva, A.E.D.F., Rodrigues, L.H., Vieira, F.V., Deragon, L.A.G., Kastelic, J.P. (2002b). Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. *Anim. Reprod. Sci.*; 70(3-4):181-190.

Briz, M.; Bonet, S.; Pinart, B.; Camps, R. (1996). Sperm malformations throughout the boar epididymal duct. *Anim. Reprod. Sci.*; 43:221-239.

Brogliatti, G., García, F., Cavia, R., Larraburu, G., Albrecht, A. (2004). 12 CASA parameters of fresh bull semen collected by artificial vagina or electroejaculation in Argentina. *Reprod. Fertil. Dev.*; 17:156-156.

Bungum, M., Humaidan, P., Axmon, A., Spano, M., Bungum, L., Erenpreiss, J. Giwerzman, A. (2007). Sperm DNA integrity assessment in prediction of assisted reproduction technology outcome. *Hum. Reprod.*; 22:174-179.

Buxadé, C. (1996). Producciones equinas y de ganado de lidia. Tomo XI. Ed. Mundi-Prensa, Madrid. 350.

Calero, R., Bravo, J.A., Bartolomé, P. (2007). Agricultura y Ganadería Extremeñas. Informe 2007, Badajoz. 203-226.

Calero, R., Gómez-Nieves, J.M., Carnero, J. (2002). El Devenir histórico de la Estación Pecuaria Regional a Centro de Selección y Reproducción Animal en Badajoz. Ed. Academia de Ciencias Veterinarias. 229-230.

Calvin, H., Bedford, J. (1971). Formation of disulfide bonds in the nucleus and accessory structures of mammalian spermatozoa during maturation in the epididymis. J. Reprod. Fertil.; 13 (Supl. 13): 65-75.

Cañón, J. (2008). Mejora genética en el ganado de lidia: los métodos de selección. Manual de reproducción y genética del toro de lidia. Ed. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León; 1:60-72.

Cañón, J., Tupac-Yupanqui, I., García-Atance, M., Cortés, O., García, D., Fernández, J., Dunner, S. (2008). Genetic variation within the lidia bovine breed. Animal genetics; 39(4):439-445.

Carretero, M.I., Lombardo, D., Arraztoa, C.C., Giuliano, S.M., Gambarotta, M.C., Neild, D.M. (2012). Evaluation of DNA fragmentation in llama (< i> Lama glama</i>) sperm using the sperm chromatin dispersion test. Anim. Reprod. Sci.; 131(1):63-71.

Castelló, R., Díaz, D. (2001). La Blanca Cacereña. Patrimonio Histórico. Rev. Ganadería.; 8:22-23.

Centola, G., Ginsburg, K. (1996). Evaluation and treatment of infertile male. Cambridge University Press. Cambridge. United Kingdom. 263-276.

- Chandler, J.E., Adkinson, R.W. (1990).** Genetic and non-genetic contributions to variation in spermatozoal morphology of mature Holstein bulls. In: Proceeding of the NAAB 13th Technical Conference on AI and Reprod.; 57-62
- Chandler, J.E., Adkinson, R.W., Nebel, R.L. (1984).** Thawing optimums for bovine spermatozoa processed by three methods and packaged in Continental and French straws. J. Dairy Sci.; 67:398-404.
- Chang, J., Shih, L., Yu L., Liao, H., Liu, J. (2004).** Apoptosis induced by bovine ephemeral fever virus. J. Virol. Methods; 122:165-170.
- Chen, H., Chow, P.H., Cheng, S.K., Cheung, A.L., Cheng, L.Y, WS, O.(2003).** Male genital tract antioxidant enzymes: Their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. J. Androl.; 24:704-711.
- Chenoweth, P.J. (2005).** Genetic sperm defects. Theriogenology; 64:457-468.
- Chohan, K., Griffin, J., Lafromboise M., De Jonge C., Carrell D. (2006).** Comparison of chromatin assays for DNA fragmentation evaluation in human sperm. J Androl.; 27(1):53-59.
- Christensen, P., Brockhoff, P. B., Lehn-Jensen, H. (1999).** The relationship between semen quality and the non-return rate of bulls. Reprod. Dom. Anim.; 23:503-507.
- Chung, J. (1997).** Effects of sperm treatments on fertilization and in vitro development of bovine follicular oocytes. Korean J. Emb. Trans.; 12(2):189-194.
- Coddington, A.M., Hales, B.F., Robaire, B. (2004).** Spermiogenic germ cell phase-specific DNA damage following cyclophosphamide exposure. J. Androl.; 25(3):354-362.

Colenbrander, B., Gadella, B. (2003). The predictive value of semen analysis in the evaluation of stallion fertility. *Reprod. Dom. Anim.*; 38:305-311.

Compan, H. (2008). Nuevas tendencias en la alimentación de toros y novillos. *Manual de manejo y nutrición del Toro de Lidia*. Ed. Instituto Tecnológico Agrario (Itacyl). Tomo I. 20-39.

Cooke, M.S., Evans, M.D., Dizdaroglu, M., Lunec, J. (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *J. FASEB*; 17:1195-1214.

Cortés, O., Tupac Yupanqui, I., Dunner, S., Fernández, J., Cañón, J. (2011). Y chromosome genetic diversity in the Lidia bovine breed: a highly fragmented population. *J. Anim. Breed. Genet.*; 128(6):491-496.

Cortés-Gutiérrez E.I., Ortiz-Hernández, B.L., Dávila-Rodríguez, M.I., Cerda-Flores, R.M., Fernández, J.L., López-Fernández C, Gosálvez, J. (2013). 5-bp Classical Satellite DNA Loci from Chromosome-1 Instability in Cervical Neoplasia Detected by DNA Breakage Detection/Fluorescence in Situ Hybridization (DBD-FISH). *Int J Mol Sci.* 19; 14(2):4135-4147.

Cortés-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., López-Fernández, C, Fernández, J.L., Crespo, F., Gosálvez, J. (2014). Localization of alkali-labile sites in donkey (*Equus asinus*) and stallion (*Equus caballus*) spermatozoa. *Theriogenology*; 81(2):321-325.

Cortés-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., Fernández, J.L., López-Fernández, C., Gosálvez, J. (2011). DNA damage in women with cervical neoplasia evaluated by DNA breakage detection-fluorescence in situ hybridization. *Anal Quant Cytol Histol.*; 33(3):175-81.

Cortés-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Gosálvez, J. (2007). Evaluación del daño en el ADN espermático. *Actas Urológicas Esp.*; 31(2):120-131.

Cortes-Gutiérrez, E.I., Dávila-Rodríguez, M.I., López-Fernández, C, Fernández, J.L., Gosálvez, J. (2008). DNA fragmentation in frozen sperm of *Equus asinus*: Zamorano-Leones, a breed at risk of extinction. *Theriogenology*; 69(8):1022-1032.

Corzett, M, Mazrimas, J., Balhorn, R. (2002). Protamine 1: Protamine 2 Stoichiometry in the sperm of Eutherian mammals. *Mol. Reprod. Dev.*; 61:519-527.

Cupps, P.T., Briggs, J.R. (1998). Changes in the epididymis associated with morphological changes in the spermatozoa. *J. Dairy Sci.*; 48:1241-1244.

Dadoune, J. (2003). Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. *Microsc. Res. Tech.*; 61:56-75.

Darzynkiewicz, Z., Traganos, F. Sharpless, T., Melamed, M. (1975). Thermal denaturation of DNA in situ as studied by Acridine Orange staining and automated cytofluorometric. *Exp. Cell. Res.*; 90: 411-428.

Davis, R., Siemers, R. (1995). Derivation and reliability of kinematic measures of sperm motion. *Reprod. Fertil. Dev.*; 7:857-869.

De la Fuente, J.; Monleon, M.; Yepes, J. (1994). Aplicación de tecnologías reproductivas en el ganado avileño. *Rev. Bovis*; 59:59-79.

Decreto 295/2011, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la reglamentación específica del Libro Genealógico, Programa de mejora en su modalidad de conservación, control de rendimientos y evaluación genética de la raza autóctona en peligro de extinción: Raza Bovina Blanca Cacereña. D.O.E nº 244. Ed. Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Energía de Extremadura.

Derijck, A., Van der Heijden, G., Giele, M., Philippens, M., de Boer, P. (2008). DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation. *Hum. Mol. Genet.*; 17: 1922-1937.

Derivaux, J. (1982). Reproducción de los animales domésticos. Trad. por José Gómez Piquer. 2ª Ed. ACRIBIA Zaragoza. 486.

Des Daas, N. (1992). Laboratory assessment of semen characteristics. *Anim. Reprod. Sci.*; 28:87-94.

Dhawan, A., Bajpayee, M., Parmar, D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell. Biol. Toxicol.*; 25:5-32.

Didion, B.A., Kasperperson, K.M., Wixon, R.L., Evenson, D.P. (2009). Boar fertility and sperm chromatin structure status: a retrospective report. *J. Androl.*; 30(6):655-660.

Dobrinski, I., Hughes, H. P. y Barth, A. D. (1994). Flow cytometric and microscopic evaluation and effect on fertility of abnormal chromatin condensation in bovine sperm nuclei. *J. Reprod. Fertil.*; 101:531-538.

Domínguez-Rebolledo A.E. (2010). Estudio del estrés oxidativo en espermatozoides epididimarios criopreservados de ciervo. Tesis doctoral, Universidad de Castilla La Mancha.

D'Occhio, M., Hengsberger, K., Jonhston, S. (2007). Biology of sperm chromatin and relationship to male fertility and embryonic survival. *Anim Reprod Sci.*; 101:1-17.

Enciso, M., Muriel, L., Fernández, JI., Goyanes, V., Segrelles, E., Marcos, M., Montejo, J.M., Ardoy, M., Pacheco, A., Gosálvez, J. (2006a). Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear

damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. *J Androl*; 27(1):106-111.

Enciso, M. (2010). La fragmentación del ADN en espermatozoides de mamíferos. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Enciso, M., López-Fernández, C., Fernández, JI., García, P., Gosálvez, A., Gosálvez, J. (2006b). A new method to analyze boar sperm DNA fragmentation under bright-field or fluorescence microscopy. *Theriogenology*; 65:308-316.

Enciso, M., Sarasa, J., Agarwal, A., Fernández, J. L., Gosálvez, J. (2009). A two-tailed comet assay for assessing DNA damage in spermatozoa. *Reprod. Biomed. On line*; 18:609-616.

Enciso, M., Cisale, H., Johnston, S.D., Sarasa, J., Fernández, J.L., Gosálvez, J. (2011a). Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. *Theriogenology*; 76:23-32

Enciso, M., Johnston, S.D., Gosálvez, J. (2011b). Differential resistance of mammalian sperm chromatin to oxidative stress as assessed by a two-tailed comet assay. *Reprod. Fertil. Dev.*; 23(5):633-637.

Erenpreiss, J., Hlevicka, S., Zalkalns, J., Erenpreisa, J. (2002). Effect of leukocytospermia on sperm DNA integrity: a negative effect in abnormal semen samples. *J. Androl.*; 23:717-723.

Erenpreiss, J., Erenpreiss, J., Freivalds, T., Slaidina, M., Krampe, R., Butikova, J., Ivanov, A., Pjanova, D. (2003). Toluidine blue test for sperm DNA integrity and elaboration of image cytometry algorithm. *Cytometry A.*; 52(1):19-27.

Evenson, D.P., Darzynkiewicz, Z., Melamed, M. (1980). Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. *Science*; 240: 1131-1133.

Evenson, D.P. (1983). Rapid analysis of normal and abnormal cell types in human semen and testis biopsies by flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.*; 31:248-253.

Evenson, D.P. (1989). Flow Cytometry: Advanced research and clinical applications. Ed. A. Yen; CRC Press. Boca Raton. Florida. EEUU. Tomo 1, 217-246.

Evenson, D.P. (1999). Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reprod. Fertil. Dev.*; 11(1):1-15.

Evenson, D.P., Jost, L. (1994). Sperm chromatin structure assay: DNA desnaturability. *Methods Cell. Biol.*; 42:159-76.

Evenson, D., Jost, L., Baer, R. (1993). Effects of methyl methanesulfonate on mouse sperm chromatin structure and testicular cell kinetics. *J. Environ. Mol. Mutagen.*; 21:144-153.

Evenson, D.P., Jost, L., Marshall, D., Zinaman, M., Clegg, G., Purvis, K., De Angelis, P., Claussen, O. (1999). Utility of sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum. Reprod.*; 14:1039-1049.

Evenson, D.P., Larson, K., Jost, L. (2002). Sperm Chromatin Structure Assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J Androl.*; 23:25-43.

Evenson, D.P., Tritle, D. (2004). SCSA is a direct measure of sperm DNA fragmentation. *Fertil. Steril.*; 82(2):S174-S175.

Evenson D.P., Thompson, L., Jost, L. (1994). Flow Cytometric: Evaluation of boar semen by the Sperm Chromatin Structure Assay as related to cryopreservation and fertility. *Theriogenology*; 41:637-51.

Evenson, D.P.; Wixon, R. (2005). Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 207:532-537.

Evenson, D., Wixon, R. (2006). Clinical Aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*; 65:979-991.

Fatehi, A., Bevers, M., Schoevers, E., Roelen, B., Colenbrander, B., Gadella, B. (2005). DNA damage in bovine sperm cells does not block fertilization but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl.*; 27:176-188.

Fernández, J.L., Vázquez-Gundín, F., Delgado, A., Goyanes, V., J, Ramiro-Díaz, J., De la Torre, J., Gosálvez, J. (2000). DNA Breakage Detection-Fish (DBD-Fish) in human spermatozoa: technical variants evidence different structural features. *Mutat. Res.*; 453(1):77-82.

Fernández, J.L., Gosálvez, J., Santiso, R., Goyanes, V., López-Fernández, C. (2007). In: Valentino, R.G. (Ed.), *Adaptation of the Sperm Chromatin Dispersion (SCD) Test to Determine DNA Fragmentation from Bull Sperm*. Nova Biochemical Books, New York. . 69-84.

Fernández, J.L., Goyanes, V., Gosálvez, J. (2002). DNA Breakage Detection-FISH (DBD-FISH). *FISH Technology*. Springer Berlin Heidelberg. 282-290.

Fernández, J.L., Muriel, L., Rivero, M., Goyanes, V., Vázquez, R., Álvarez J. (2003). The Sperm Chromatin Dispersion Test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J. Androl.*; 24(1):59-66.

Fernández, J.L., Muriel, L., Goyanes, V., Segrelles, E., Gosálvez, J., Enciso, M., Lafromboise, M., De Jonge, C. (2005). Simple determination of human sperm DNA fragmentation with an improved Sperm Chromatin Dispersion Test (SCD). *Fertil. Steril.*; 84(4):833-842.

Fernández-González, R., Moreira, P.N., Pérez-Crespo, M., Sánchez-Martín, M., Ramírez, M.A., Pericuesta, E., Bilbao, A., Bermejo-Álvarez, P., Hourcade, J.D., Rodríguez de Fonseca, F., Gutiérrez-Adán, A. (2008). Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biol. Reprod.*; 78:761-772

Fernández-Santos, M., Martínez-Pastor, F., García-Macías, V., Estes, M., Soler, A., Paz, P., Anel, L., Garde, J. (2006). Sperm characteristics and DNA Integrity of Iberian Red Deer (*Cervus elaphus hispanicus*) Epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and non-enzymatic antioxidants. *J. Androl.*; 28:294-305.

Fernández-Santos, M.R., Martínez-Pastor, F., Matías, D., Domínguez-Rebolledo, A.E., Estes, M.C., Montoro, V., Garde, J.J. (2009). Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*; 111:93-104.

Fingerovaa, H., Novotnyb, J., Barborikc, J., Brezinovaa, J., Svobodovaa, M., Krskovad, M., Obornaa, I. (2007). Antioxidant capacity of seminal plasma measured by TAS randox®. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.*; 151:37-40.

Fischer, M., Willis, J., Zini, A. (2003). Human Sperm DNA Integrity: Correlation with sperm cytoplasmic droplets. *Urology*; 61(1):207-211.

Foresta, C., De Carlo, E., Mioni, R., Zorzi, M. (1989). Sperm nuclear chromatin heterogeneity in infertile subjects. *Andrology*; 21:384-390.

Fortes, M.R., Holroyd, R.G., Reverter, A., Venus, B.K., Satake, N., Boe-Hansen, G.B. (2012). The integrity of sperm chromatin in young tropical composite bulls. *Theriogenology*. 78(2):326-33.

Fouchecourt, S., Metayer, S., Locatelli, A., Dacheux, F., Dacheux, J. (2000). Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of mayor proteins. *Biol. Reprod.*; 62:1729-1830.

Fraser, L. (2004). Structural damage to nuclear DNA in mammalian spermatozoa: its evaluation techniques and relationship with male infertility. *Pol. J. Vet. Sci.*; 7(4):311-321.

Fraser, L., Strezežék, J. (2004). The use of comet assay to asses DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5°C and 16°C. *Folia Histochem Cytobiol.*; 42: 49-55.

Fuentes-Mascorro, G., Serrano, H., Rosado, A. (2000). Sperm Chromatin. *Ach. Androl.*; 45:215-225.

Fuerst-Waltl, B., Reichl, A., Fuerst, C., Baumung, R., Sölkner, J. (2004). Effect of maternal age on milk production traits, fertility, and longevity in cattle. *J. Dairy Sci.*; 87(7):2293-2298.

Fuerst-Waltl, B., Schwarzenbacher, H., Perner, Ch., Solkner, J. (2006). Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *An. Reprod. Sc.*; 95: 27-37.

Gallegos, G., Ramos, B., Santiso, R., Goyanes, V., Gosálvez, J., Fernández, J. (2008). Sperm DNA fragmentation in infertile men with genitourinary infection by Chlamydia Trachomatis and Mycoplasma. *Fertil. Steril.*; 90:328-334.

Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caponecchia, L., Familiari, G., Verlengia, C., Dondero, F.; Lenzi, A. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*; 15: 830-839.

García-Contreras, A., De Loera, Y., García-Artiga, C., Palomo, A., Guevara, J. A., Herrera-Haro, J., López-Fernández, C., Jonhston, S., Gosálvez, J. (2011).

Elevated dietary intake of Zn-methionate is associated with increased sperm DNA fragmentation in the boar. *Reprod. Toxicol.*; 31(4):570-573.

García-Macías, V., De Paz, P., Martínez-Pastor, F., Alvarez, M., Gomes-Alves, S, Bernardo, J., Anel, E., Anel, L. (2007). DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm Bos Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. *Int. J. Androl.*; 30:88-98.

García-Macías, V., Martínez-Pastor, F., Álvarez, M., Borragan, S., Chamorro, C., Soler, A., Anel, L., de Paz, P. (2006a). Seasonal changes in sperm chromatin condensation in ram (*Ovis aries*), Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*), and brown bear (*Ursus arctos*). *J Androl.*; 27:837-846.

García-Macías, V., Martínez-Pastor, F., Álvarez, M., Garde, J., Anel, E., Anel, L., de Paz, P. (2006b). Assessment of chromatin status (SCSA) in epididymal and ejaculated sperm in Iberian red deer, ram and domestic dog. *Theriogenology*; 66:1921-1930.

García-Peiró, A., Martínez-Heredia, J., Oliver-Bonet, M., Abad, C., Amengual, M.J., Navarro, J., Jones, C., Coward, K., Gosálvez, J., Benet, J. (2011). Protamine 1 to protamine 2 ratio correlates with dynamic aspects of DNA fragmentation in human sperm. *Fertil. Steril.* 95:105-109.

García-Peiró, A., Oliver-Bonet, M., Navarro, J., Abad, C., Amengual, M.J., López-Fernández, C., Gosálvez, J., Benet, J. (2012). Differential clustering of sperm subpopulations in infertile males with clinical varicocele and carriers of rearranged genomes. *J. Androl.*; 33:361-367.

Gaudio, V., Riol, J. (1996). Producciones equinas y de ganado de lidia. Tomo XI. Capítulo XVII. Ed. Mundiprensa, Madrid. 269-279.

Gerber, D., Irons, P., Herold, F., Cooper, D. (2002). Quality and freezability of epididymal sperm from African buffalo (*Syncerus Caffer*) following prolonged exposure to ambient temperatures or delayed flushing. *Theriogenology*; 57:582.

Gledhill, B. (1966). Studies of the DNA content, dry mass and optical area of morphologically normal and abnormal bull spermatozoal heads. *Acta Vet. Scand.*; 7:1-20.

Gliozzi, T.M., Zaniboni, L., Cerolini, S. (2011). DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*; 75(9):1613-1622.

Gillan, L., Kroetsch, T., Chis Maxwell, W.M., Evans, G. (2008). Assessment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim. Reprod. Sci.*; 103:201-214

Giwerzman, A., Richthoff, J., Hjollund, H., Bonde, J., Jepson, K., Frohm, B., Spano, M. (2003). Correlation between sperm motility and Sperm Chromatin Structure Assay parameters. *Fertil. Steril.*; 80:1404-1412.

Golan, R., Cooper, T.G., Oschr,y Y., Oberpenning, F., Schulze, H., Shochat, L., Lewin, LM. (1996). Changes in chromatin condensation of human spermatozoa during epididymal transit as determined by flow cytometry. *Hum Reprod.*; 11:1457-1462.

González, P., Muñón, M.J., Vallejo, M. (1987). Genetic relationships between seven Spanish native breeds of cattle. *Anim. Genet.*; 18:249-256.

González-Marín, C., Gosálvez, J., Roy, R. (2012a). Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int. J. Mol. Sci.*; 13(11):14026-14052.

Gonzalez-Marín, C., Kjelland, M. E., Roy, R., López-Fernández, C., Fernández, J. L., Moreno, J. F., Gosálvez, J. (2012b). Use of quinolones in bull

semen extenders to reduce sperm deoxyribonucleic acid damage. *Am. J. Anim. Vet. Sci.*; 7(4):180-185.

González-Marín, C.; Roy, R.; López-Fernández, C.; Díez, B.; Carabaño, M.J., Fernández, J.L.; Kjelland, M.E.; Moreno, J.F.; Gosálvez, J. (2011). Bacteria in bovine semen can increase sperm DNA fragmentation rates: A kinetic experimental approach. *Anim. Reprod. Sci.*; 123, 139-148.

Gorczyca, W., Gong, J., Darzynkiewicz, Z. (1993). Detection of DNA strand breaks in individual apoptotic cells by the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays. *Cancer Res.*; 53(8):1945-1951.

Gosálvez, J., Cortés-Gutiérrez, E., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Caballero, P., Nuñez, R. (2009). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation dynamics in fertile donors. *Fertil. Steril.*; 92(1):170-173.

Gosálvez, J., Fernández, J.L., Gosálbez, A., Arrollo, A., Agarwal, A., López-Fernández, C. (2007). Dynamics of sperm DNA fragmentation in mammalian species as assessed by the SCD methodology. *Fertil. Steril.*; 88:S365- S365.

Gosálvez, J., Fernández, J.L., Goyanes, V., López-Fernández, C. (2006). Análisis de la fragmentación del ADN en espermatozoides mediante el test de dispersión de la cromatina (SCD). *Biotechnology*; 1:38-51.

Gosálvez, J.; González-Martínez, M.; López-Fernández, C.; Fernández, J.L.; Sánchez-Martín, P. (2011d). Shorter abstinence decreases sperm deoxyribonucleic acid fragmentation in ejaculate. *Fertil. Steril.*; 96:1083-1086.

Gosálvez, J., López-Fernández, C., Fernández, J.L., Gouraud, A., Holt, H.V. (2011c). Correlations between the dynamics of iatrogenic DNA damage and genomic design in mammalian spermatozoa from 11 species. *Mol Reprod De*; 78:951-961.

Gosálvez, J., Ramírez, M. A., López-Fernández, C., Crespo, F., Evans, K. M., Kjelland, M. E., Moreno, J. F. (2011a). Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology*; 75:197-205.

Gosálvez, J., Ramírez, M. A., López-Fernández C., Crespo, F. K., Evans, M., Kjelland M. E., Moreno, J. F. (2011b). Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Dynamic features. *Theriogenology*; 75:206-211.

Gosálvez, J., Rodríguez-Predreira, M., Mosquera, A., López-Fernández, C., Esteves, S.C., Agarwal, A., Fernández, J.L. (2013). Characterisation of a subpopulation of sperm with massive nuclear damage, as recognised with the Sperm Chromatin Dispersion test. *Andrology*; 1-8.

Gosálvez, J., Vázquez, J.M., Enciso, M., Fernández J.L., Gosálvez, A., Bridle J.J., López-Fernández, C. (2008). Sperm DNA fragmentation in rams vaccinated with Miloxan. *J. Open. Vet. Sci.*; 2:7-10.

Graham, J. K. (1994). Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology*; 41(5):1151-1162.

Graham, E., Schmehl, M., Nelson, D. (1980). Problems with laboratory assays. *Proc. 8º NMB. Tech. Conf. Al. Reprod.*; 59-66.

Gravance, C., Vishwanath, R., Pitt, C., Garner, D., Casey, P. (1998). Effects of cryopreservation on bull sperm head morphometry. *J. Androl.*; 19:704-709.

Graves, C. N. (1978). Semen and its component. In: G. W. Salisbury, N. L. VanDemark and J. R. Lodge (eds.) *Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle*, WH Freeman and Company, San Francisco, EEUU. 247-285.

Guerra Guerrita, R. (1896). *La Tauromaquia*. 4º Ed. Núñez Samper, Tomo I y II, Madrid.

Hallap, T., Häärd, M., Jaakma, U., Larsson, B., Rodríguez-Martínez, H. (2004). Variations in quality of frozen-thawed semen from Swedish Red and White AI sires at one and four years of age. *J. Androl.*; 27:166-171.

Hallap, T., Jaakma, U., Rodríguez-Martínez, H. (2006). Changes in semen quality in Estonian Holstein AI bulls at 3, 5 and 7 years of age. *Reprod. Dom. Anim.*; 41: 214-218.

Hafez, C. (1989). Reproducción e inseminación artificial en animales. 5° Ed. Interamericana Mc.Graw-Hill. Mexico. : 694.

Hecht, N.B. (1998). Molecular mechanism of male germ cell differentiation. *Bioassays*; 20:555-561.

Hellman, B., Vaghef, H., Bostrom, B. (1995). The concepts of tail moment and tail inertia in the single cell gel electrophoresis assay. *Mut. Res. DNA Repair*; 336(2):123-131.

Henault, M.A., Killian, G.J., Kavanaugh, J.F., Griel, L.C. (1995). Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. *Biol. Reprod.*; 52: 390-397.

Hingst, O., Blottner, S. (1995). Quantification of apoptosis (programmed cell death in mammalian testis by DNA-fragmentation Elisa. *Theriogenology*; 44(3):313-319.

Hoflack, G., Opsomer, G., Rijsselaere, T., Van Soom, A., Maes, D., de Kruif, A., Duchateau, L. (2007). Comparison of computer-assisted sperm motility analysis parameters in semen from Belgian Blue and Holstein Friesian Bulls. *Reprod. Dom. Anim.*; 42:153-161.

Holt, W.V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Anim. Reprod. Sci.*; 62:3-22.

Igboeli, G., Foote, R. H. (1968). Maturation changes in bull epididymal spermatozoa. *J. Dairy Sci.*; 51: 1703-1705.

Imrat, P., Mahasawangkul, S., Gosálvez, J., Suthanmapinanth, P., Sombutputorn, P., Jansittiwate, S., Thongtip, N., Pinyopummin, A., Colenbrander, B., Holt, W.V., Stout, T.A.E. (2012). Effect of cooled storage on quality and DNA integrity of Asian elephant (*Elephas maximus*) spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.*; 24:1105-1116

Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodríguez-Martínez, H. (2001). Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. *Theriogenology*; 55: 947-961.

Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodríguez-Martínez, H. (2003). Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. *Theriogenology*; 60:743-758.

Ji, B.T., Shu, X.O., Linet, M.S., Zheng, W., Wacholder, S., Gao, Y.T., Ying D.M., Jin, F. (1997). Paternal cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J. Natl. Cancer Inst.*; 89(3):238-244.

Jiménez-Rabadán, P. (2013). Advances in sperm cryopreservation of samples collected by vagina artificial and electroejaculation collection from Blanca-Celtibérica goat breed. Tesis doctoral. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos. Universidad de Castilla la Mancha.

Johnson M., Everitt B. (1984). *Essential Reproduction*. 2ª Ed. Blackwell Scientific Publications, Londres, England. 296.

Johnston, S.D., López-Fernández, C., Gosálvez, A., Zee, Y., Holt, W.V., Allen, C., Gosálvez, J. (2007). The relationship between sperm morphology and

chromatin integrity in the koala (*Phascolarctos cinereus*) as assessed by the sperm chromatin dispersion test (SCDt). *J. Androl.*; 28(6):891-899.

Johnston, S. D., Zee, Y. P., López Fernández, C., Gosálvez, J. (2012). The effect of chilled storage and cryopreservation on the sperm DNA fragmentation dynamics of a captive population of koalas. *J. Androl.*; 33(5):1007-1015.

Juriscova, A.; Acton, B.M. (2004). Deadly decisions: The role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. *Reproduction*; 128:281-291.

Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Boixo, J.C., Rouissi, H., Herraez, P., Anel, L. (2003). Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*; 60: 1249-1259.

Karabinus, D.S., Evenson, D.P., Jost, L., Baer, R., Kaproth, M. (1990). Comparison of semen quality in young and mature Holstein bulls measured by light microscopy and flow cytometry. *J. Dairy Sci.*; 73(9):2364-2371.

Karabinus, D.S., Evenson, D.P., Kaproth, M.T.E. (1991). Effects of egg yolk-citrate and milk extenders on chromatin structure and viability of cryopreserved bull sperm. *J. Dairy Sci.*; 74: 3836-3848.

Karabinus, D.S., Vogler, C.J., Saacke, R.G., Evenson, D.P. (1997). Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. *J. Androl.*; 18:549-549.

Kasimanickam, R., Nebel, R., Peeler, I., Silvia, W., Wolf, K., Mcallister, A., Cassell, B. (2006). Breed differences in competitive indices of holstain and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. *Theriogenology*; 66:1307-1315.

Karoui, S., Díaz, C., Serrano, M., Cue, R., Celorrio, I., Carabaño, M.J. (2011). Time trends, environmental factors and genetic basis of semen traits collected in Holstein bulls under commercial conditions. *Anim. Reprod. Sci.*; 124: 28-38.

Karoui, S., Díaz, C., González-Marín, C., Amenabar, M. E., Serrano, M., Ugarte, E., Gosálvez, J., López-Fernández, Carabaño, M. J. (2012). Is sperm DNA fragmentation a good marker for field AI bull fertility?. *J. Anim. Sci.*; 90(8):2437-2449.

Kennedy, R. (1998). The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology*; 50:955-972.

Khalifa, T.A., Rekkas, C.A., Lymberopoulos, A.G., Sioga, A., Dimitriadis, I., Papanikolaou, T. (2008). Factors affecting chromatin stability of bovine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*; 104:143-163.

Kierszenbaum, A. (2001). Transition nuclear proteins during spermiogenesis: unrepaired DNA breaks not allowed. *Mol. Reprod. Dev.*; 58:357-358.

Koonjaenak, S., Chanatinart, V., Ekwall, H., Rodríguez-Martínez, H. (2007). Morphological features of spermatozoa of Swamp Buffalo AI Bulls in Thailand. *J. Vet. Med. A.*; 54:169-178.

Kosower, N., Katayose, H., Yanagimachi, R. (1992). Thiol-Disulfide status and Acridine Orange fluorescence of mammalian sperm nuclei. *J. Androl.*; 13(4):342-348.

Larson, K.L., DeJonge, C.J., Barnes, A.M., Jost, L.K., Evenson, D.P. (2000). Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. *Hum. Reprod.*; 15:1717-1722.

Latif, M.A., Ahmed, J.U., Bhuiyan, M.M.U., Shamsuddin, M. (2009). Relationship between scrotal circumference and semen parameters in crossbred bulls. *The Bangladesh Veterinarian*; 26(2): 61-67.

Latini, M., Gandini, L., Lenzi, A., Romanelli F. (2004). Sperm tail agenesis in a case of consanguinity. *Fertil. Steril.*; 81(6):1688-91

Loomis, P. R., Graham, J. K. (2008). Commercial semen freezing: individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customised freezing protocols. *Anim. Reprod. Sci.*; 105:119-128.

Lopes, S., Sun, J., Jurisicova, A., Meriano, J., Casper, R. (1998). Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.*; 69(3):528-532.

López, A., Pérez-Clariget, R., Álvarez, F., Queirolo, D., Burgueño, J. (2007). Influencia de factores medioambientales sobre la producción espermática en toros del Uruguay. APPA-ALPA. Cusco. Perú.

López-Fernández, C., Crespo, F., Arroyo, F., Fernández, J. L., Arana, P., Johnston, S. D. y Gosálvez, J. (2007). Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology* 68, 1240-1250.

López-Fernández, C., Fernández, J. L., Gosálbez, A., Arroyo, F., Vazquez, J. M., Holt, W. V. Gosálvez, J. (2008a). Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals III. Ram. *Theriogenology*; 70:898-908.

López-Fernández, C., Gage, M.J., Arroyo, F., Gosálbez, A., Larránz, A.M., Fernández, J.L., Gosálvez, J. (2009). Rapid rates of sperm DNA damage after activation in tench (*Tinca tinca*: Teleostei, Cyprinidae) measured using a sperm chromatin dispersion test. *Reproduction*; 138:25-66.

López-Fernández, C., Gosálvez, J. (2012). Seeing sperm DNA fragmentation in rabbits. *Mol Reprod Dev.*; 79(1):1.

- López-Fernández, C., Johnston, S.D., Gosálbez, A., Gosálvez, J. (2011).** Seasonal changes in sperm DNA fragmentation of Murciano-Granadina goats: the compelling case for dynamic assessment. *Small. Rum. Res.*; 100:50-53.
- López-Fernández, C., Johnston, S.D., Fernández, J.L., Wilson, R.J., Gosálvez, J. (2010).** Fragmentation dynamics of frozen-thawed ram sperm DNA is modulated by sperm concentration. *Theriology*; 74: 1362-1370
- López-Fernández, C., Pérez-Llano, B., García-Casado, P., Sala, R., Gosálvez, A., Arroyo, F., Fernández, J., Gosálvez, J. (2008b).** Sperm DNA Fragmentation in a random sample of the spanish boar livestock. *Anim. Reprod. Sci.*; 103(1-2):87-98.
- Love, C., Kenney, R. (1998).** The relationship of increased susceptibility of sperm DNA to denaturation and fertility in the stallion. *Theriogenology*; 50:955-972.
- Macinnes, J., Uretz, R. (1966).** Spectral analysis of the binding of acridine orange to polytene chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; 55(5):1109-1113.
- Madrid, N., Ott, R., Rao, D., Parret, D., Vanderwert, W., Willms, C. (1988).** Scrotal circumference, seminal characteristics, and testicular lesions of year linn Angus bulls. *Am. J. Vet. Res.*; 49:579:584.
- MAGRAMA, ARCA (2014).** Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Sistema ARCA. [http: www.magrama.gob.es](http://www.magrama.gob.es)
- Malama, E., Kiossis, E., Theodosiou, T., Boscós, C., Bollwein, H. (2012).** Lag effect of microclimatic conditions on DNA integrity of frozen-thawed bovine sperm. *Anim Reprod Sci.*; 136:33-41.
- Mandal, D.K., Kumar, M., Tyagi, S. (2010).** Effect of age on spermiogram of Holstein Friesian x Sahiwal Crossbred bulls. *Animal*; 4: 595-603.

Malcotti, V., Pelufo, V., Bergamo, N., Aisen, E. (2012). Recovery of epididymal spermatozoa from bull and red deer, stored at different times and temperatures before freezing–thawing. *Anim. Prod. Sci.*; 52:741-745.

Marco-Jiménez, F., Vicente, J.S., Viudes-de-Castro, M.P. (2008). Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram. *Reprod. Domest. Anim.*; 43:403-408.

Marcon, L., Boissonneault, G. (2004). Transient DNA strand breaks during mouse and human spermiogenesis new insights in stage specificity and link to chromatin remodeling. *Biol. Reprod.*; 70(4):910-918.

Martin, G., Sabido, O., Durand, P., Levy, R. (2004). Cryopreservation induces an apoptosis-like mechanism in bull sperm. *Biol. Reprod.*; 71(1): 28-37.

Martínez, F.A. (2005). Studies on the interaction of chromatin-unstable boar sperm with the female reproductive tract. Thesis. Institute of Reproductive Medicine, University of Veterinary Medicine-Hannover, Germany.

Martínez-Pastor, F., Johannisson, A., Gil, J., Kaabi, M., Anel, L., Paz, P., Rodríguez-Martínez, H. (2004). Use of chromatin stability assay mitochondrial stain jc-1 and fluorometric assessment of plasma membrane to evaluate frozen-thawed ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*; 84:121-33.

Martínez-Pastor, F., Díaz-Corujo, A.R., Anel, E., Herraez, P., Anel, L., Paz P. (2005). Post mórtem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology*; 64:958-974.

Martínez-Pastor, F., Fernández-Santos, M.R., Domínguez-Rebolledo, A.E., Estesó, M.C., Garde, J.J. (2009). DNA status on thawed semen from fighting bull: A comparison between the SCD and the SCSA tests. *Reprod. Domest. Anim.*; 44:424-431.

Martins, C. F., Driessen, K, Melo, P., Carvalho-Neto, J.O., de Sousa, R.V., Rumpf, R., Dode M. (2009). Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. *Anim. Reprod. Sci.*; 116:50-57.

Martins, C.F., Rumpf, R., Pereira, D.C., Dode, M.N. (2007). Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Anim. Reprod. Sci.*; 101:326-331.

Mathevon, M., Buhr, M.M., Dekkers, J.C. (1998). Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *J.Dairy Sci.*; 81(12):3321-3330.

Mclay D., Clarke, H., (2003). Remodelling the paternal chromatin at fertilization in mammals. *Reproduction*; 125:625-633.

Mcclure, T.J. (1994). Nutritional and metabolic infertility in the cow. Ed. CAB International. Wallingford, Oxon. England. 128.

McKay, D.J., Renaux, B.S., Dixon, G.H. (1985). The amino acid sequence of human sperm protamine P1. *Biosci. Rep.*; 5:383-391.

Meistrich, M., Mohapatra, B., Shirley, C., Zhao, M. (2003). Roles of transition nuclear proteins in spermiogenesis. *Chromosoma*; 111:483-488.

Mello, M.S. (1982). Induced metachromasia in bull spermatozoa. *Histochemistry*; 74:387-392.

Mengual, L., Ballescà, J.L., Ascaso, C., Oliva, R. (2003). Marked differences in protamine content and P1/P2 ratios in sperm cells from Percoll fractions between patients and controls. *J Androl.*; 24:438-447.

Meseguer, M., Santiso, R., Garrido, N., Fernández, J. (2008). The effect of cancer on sperm DNA fragmentation as measured by the sperm chromatin dispersion test. *Fertil. Steril.*; 90(1):225-227.

Montes, F. "Paquiro"(1836) Tauromaquia completa o el arte de torear en plaza. Ed. Turner,1983, Madrid. 256.

Morrell, J., Johannisson, A., Dalin, A., Hammar, L., Sandebert, T., Rodríguez-Martínez H. (2008). Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. *Ac. Vet. Scan*; 50:2.

Morris, I., Ilott, S., Dixon, L., Brison, D. (2002). The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis(comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum. Reprod.*; 17:990-998.

Moskovtsev, S.I., Willis, J., White, J., & Mullen, J.B.M. (2009). Sperm DNA damage: correlation to severity of semen abnormalities. *Urology*; 74(4):789-793.

Moustafa, M., Sharma, R., Thorton, J., Mascha, E., Abdel-Hafes, M., Thomas, A., Agarwal, A. (2004). Relationship between ROS production, apoptosis and DNA desnaturation in spermatozoa from patients examined for fertility. *Hum. Reprod.*; 19(1):129-138.

Muñoz, R., Fernández, M. y Peña, A.I. (2006). Parámetros cinéticos de eyaculados bovinos de toros de raza Frisona y Rubia Gallega. *ITEA: Información Técnica Económica Agraria*; 102: 55-66.

Muñoz, R., Peña, A.I., Rodríguez, A., Tamargo, C., Hidalgo, C.O. (2009). Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. *Theriogenology*; 72:860-868.

Muriel, N. Garrido, J. Fernández, Remohí J., Pellicer, A., De Los Santos, M., Meseguer, M. (2006) Value of the sperm deoxyribonucleic acid fragmentation level,

as measured by the Sperm Chromatin Dispersion test, in the outcome of in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil. Steril.*; 85(2):371-383.

Nagy, S., Johannisson, A., Wahlsten, T., Ijäs, R., Andersson, M., Rodríguez-Martínez H. (2013). Sperm chromatin structure and sperm morphology: Their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires *Theriogenology*; 79(8):1153-1161.

Nakazawa, Y., Shimada, A., Noguchi, J., Domeki, I., Kaneko, H., Kikuchi, K. (2002). Replacement of nuclear protein by histone in pig sperm during “in vitro” fertilization. *Reproduction*; 124:565-72.

Nava-Trujillo, H.; Quintero-Moreno, A., Finol-Parra, G., Carruyo, G., Vilchez-Siu, V., Osorio-Meléndez, C., Rubio-Guillén J., Valeris-Chacín, R. (2011). Relationship among damaged chromatin, motility and viability in cryopreserved spermatozoa from Brahman bulls. *Rev. Colomb. Cienc. Pec.*; 24: 2.

Núñez-Calonge, R., Caballero, P., López-Fernández, C., Guijarro, J.A., Fernández, J.L., Johnston, S., Gosálvez, J. (2012). Na improved experimental model for understanding the impact of sperm DNA fragmentation on human pregnancy following ICSI. *Reprod. Sci.*; 19:1163-1168.

Núñez-Martínez, I., Moran, J., Pena, F. (2005). Do computer-assisted, morphometric-derived sperm characteristics reflect DNA status in canine spermatozoa? *Reprod. Domest. Anim.*; 40:537-543.

Oliva, R., Dixon, G.H. (1990). Vertebrate protamine gene evolution I. Sequence alignments. *J Mol. Evol.* 30:333-346.

Ostermeier, G., Sargeant, G., Yandell, B., Evenson, D., Parrish, J. (2001). Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *J. Androl.*; 22:595-603.

Ostling, O., Johanson, K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 123:291-298.

Palmer, C.W. (2005). Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls *Theriogenology*; 64: 469-479.

Parejo, J.C., Sansinforiano, M.E., Rabasco, A., Martínez-Trancón, M., Fernández-García, J.L., Padilla, J.A. (1997). Optimización de la técnica RAPD en la raza vacuna Blanca Cacerena. *Arch. Zootec.*; 46: 279-284.

Parejo, J.C., Sansinforiano, M.E., Rabasco, A., Martínez-Trancón, M., Fernández-García, J.L., Padilla, J.A. (1998). Utilización de la técnica RAPD para Estudios Poblacionales en la raza bovina Blanca Cacerena. *Arch. Zootec.*; 47: 279-286.

Parejo, J.C., Padilla, J.A., Rabasco, A., Martínez-Trancón, M., Sansinforiano M.E. (2008). III Symposium nacional de razas autóctonas en peligro de extinción. Losar de la Vera, Cáceres.

Parland, S. M., Kearney, J. F., Rath, M., Berry, D. P. (2007). Inbreeding effects on milk production, calving performance, fertility, and conformation in Irish Holstein-Friesians. *J. Dairy Sci.*; 90(9):4411-4419.

Parvanov, P. (2000). Study on the effect of method of bull semen collection upon several qualitative parameters of fresh and after thawing of semen. *Bulg. J. Agric. Sci.*; 6:233-237.

Pérez-Llano, B., Enciso, M., García-Casado, P., Sala, R., Gosálvez, J. (2006). Sperm DNA fragmentation in boars is delayed or abolished by using sperm extenders. *Theriogenology*; 66:2137-2143.

- Pérez-Llano, B., López-Fernández, C., García-Casado, P., Arroyo, F, Gosálbez, A., Sala, R., Gosálvez, J. (2010).** Dynamics of sperm DNA fragmentation in the swine: ejaculate and temperature effects. *Anim. Reprod. Sc.*; 119:235-243.
- Peris, S.I., Morrier, A., Dufour, M., Bailey, J.L. (2004).** Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: Relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. *J. Androl.*; 25:224-233.
- Poccia, D. (1986).** Remodeling of nucleoproteins during gametogenesis, fertilization, and early development. *Int. Rev. Cytol*; 105: 1-65.
- Polo, S.E.; Jackson, S.P. (2011).** Dynamics of DNA damage response proteins at DNA breaks: A focus on protein modifications. *Genes. Dev.*; 25:409-433.
- Portas, T., Johnston, S. D., Hermes, R., Arroyo, F., López-Fernández, C., Bryant, B., Hildebrandt, T.B., Göritz, F., Gosálvez, J. (2009).** Frozen-thawed rhinoceros sperm exhibit DNA damage shortly after thawing when assessed by the sperm chromatin dispersion assay. *Theriogenology*; 72(5):711-720.
- Potts, R., Newbury, C., Smith, G., Notarianni, L., Jefferies, T. (1999).** Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat. Res.*; 423(1/2):103-11.
- Prinosilova P., Rybar R., Zajicova A., Hlavicova J. (2012).** DNA integrity in fresh, chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Veterinari Med.*; 57:133-142.
- Purroy, A. (2003).** Comportamiento del Toro de Lidia. En el campo, en el Ruedo. Ed. Universidad Pública de Navarra, Pamplona. 267.
- Quevedo, L. (2008).** Extracción de semen y evaluación seminal al semental de lidia. Manual de reproducción y genética del toro de lidia. Ed. Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, Valladolid; 1:28-41.

Real Decreto 60/2001, de 26 de enero. Prototipo racial de la raza bovina de Lidia. BOE nº 38 de 13 de febrero de 2001. Ed. Ministerio del Interior.

Real Decreto 145/1996, del 2 de febrero por el que se modifica y da nueva redacción al Reglamento de Espectáculos Taurinos. BOE nº 54 de 2 de marzo de 1996. Ed. Ministerio de Justicia e Interior.

Real Decreto 2129/2008, de 26 de diciembre, por el que se establece el programa nacional de conservación, mejora y fomento de las razas ganaderas. BOE nº 23 de 27 de enero de 2009. Ed. Ministerio de Medio Ambiente y Rural y Marino.

Resolución de 18 de mayo de 2011, de la Dirección General de Recursos Agrícolas y Ganaderos, por la que se publica la de 17 de mayo de 2011, por la que se aprueba el programa de mejora de la raza bovina de lidia. BOE nº 60 de 31 de mayo de 2011. Ed. Ministerio de Medio Ambiente Rural y Marino.

Reyes-Moreno, C., Gagnon, A., Sullivan, R., Sirard, M. (2000). Addition of specific metabolites to bovine epididymal cell culture medium enhances survival and motility of cryopreserved sperm. *J. Androl.*; 21(6):876-886.

Reyes-Moreno, C., Boilard, M., Sullivan, R., Sirard, M. (2002). Caracterización and identification of epididymal factors that protect ejaculated bovine sperm during in vitro storage. *Biol. Reprod.*; 66(1):159-166.

Rigby, P., Dieckman, M., Rhodes, C., Berg, P. (1977). Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.*; 113:237-251.

Robaire B., Viger. R. (1995). Regulation of epididymal epithelial cell functions. *Biol. Reprod.*; 52: 226-236.

Rodríguez, B., López-Fernández, C., Núñez-Calonge, R., Caballero, P., Martínez-Moya, M., Alonso, C., Martín, B., Rodríguez-Alonso, B., García-

Peiró, A., Gosálvez, J. (2012). Varicocele, leucocitospermia y su impacto en la fragmentación del ADN espermático. *Rev. Int. Androl.*; 10(1), 3-10.

Rodríguez Montesinos, A. (2002). Prototipos Raciales del vacuno de Lidia .Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. 270.

Rodríguez Montesinos, A. (1997). El Toro de Santa Coloma. Ed. Consejo General de Colegios Veterinarios de España, Madrid. 350.

Rodríguez Montesinos, A. (1995). Selección, consanguinidad y cruzamientos. Influencias en las líneas y castas actuales. Ponencia: II Symposium Nacional del Toro de Lidia. Ed Comité Organizador Symposium Nacional del Toro de Lidia, Zafra. Badajoz. 45-50.

Rodríguez, S., Goyanes, V., Segrelles, E., Blasco, M., Gosálvez, J., Fernández, J. (2005). Critically Short Telomeres Are Associated With Sperm DNA Fragmentation. *Fertil Steril.*; 84(4): 843-845.

Rodríguez-Martínez, H. (2007). State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod. Fertil. Dev.*; 19:91-101.

Romero, C. (2009). Raza Blanca Cacereña: Una raza en peligro de extinción. II Congreso de Estudiantes Universitarios de Ciencia, Tecnología e Ingeniería Agronómica. :157-160.

Rubes, J., Selevan, S., Evenson D., Zudova, D., Vozdova, M., Zudova, Z. (2005). Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum. Reprod.*; 20(10):2776-2783.

Ruiz-Lopez, M.J., Evenson, D.P., Espeso, G., Gomendio, M., Roldan, E.R. (2010). High levels of DNA fragmentation in spermatozoa are associated with

inbreeding and poor sperm quality in endangered ungulates. *Biol. Reprod.*; 83(3):332-338.

Rueda, L., Bartolomé, P., Vara, G. (2011). Ensayo de tres protocolos de superovulación en la Raza bovina Blanca Cacerña para la ampliación del banco de embriones. Póster: Symposium Hispano-Luso d razas autóctonas en peligro de extinción. San Vitero. Zamora.

Rybar, R., Faldikova, L., Faldyna, M., Machatcova, M., Rubes, J. (2004). Bull and boar sperm DNA integrity evaluated by sperm chromatin structure assay In the Czech Republic. *Vet. Med.*; 49:1-8.

Rybar, R., Kopecka, V., Prinosilova, P., Kubickova, S., Veznik, Z., Rubes, J. (2010). Fertil bull sperm aneuploidy and chromatin integrity in relationship to fertility. *Int. J. Androl.* 33, 613-622.

Rybar, R., Prinosilova, P., Kopecka, V., Hlavicova, J., Veznik, Z., Zajicova, A., Rubes, J. (2012). The effect of bacterial contamination of semen on sperm chromatin integrity and standard semen parameters in men from infertile couples. *Andrología*; 44:410-418.

Saacke, R.G. (1990) What is abnormal? And is abnormal dependent upon the animal? *N.A.A.B. 13th Tech. Conf. Art. Ins. Reprod.*; 67-73.

Saacke, R.G. (2002). Factors affecting fertilization in estrous synchronized cattle. *The Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle. Kansas State Univ., Manhattan, EEUU.* 163

Saacke, R.G., Nadir, S., Dalton, J., Bame, J., Dejarnette, J., Degelos, S., Nebel, R., (1994). Accessory sperm evaluation and bull fertility. *N.A.A.B. 15th Tech. Conf. Art. Ins. Reprod.*; 57-67.

- Sailer, B., Jost, L., Erickson, K., Tajiran, M., Evenson, D. (1995).** Effects of X-Irradiation on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *Environ Mol Mutagen* 25(1):23-30.
- Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, E., Bizzaro, D., Bianchi, P., Bianchi, U. (1999).** Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev. Reprod.*;4:31-37.
- Sakkas, D.; Seli, E.; Manicardi, G.C.; Nijs, M.; Ombelet, W.; Bizzaro, D. (2004).** The presence of abnormal spermatozoa in the ejaculate: Did apoptosis fail? *Hum. Fertil.*; 7:99-103.
- Salamon, S., Maxwell, W. (1995).** Frozen storage of ram semen. 1. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.*; 37:185-249.
- Saleh, R., Agarwal, A. (2002).** Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J. Androl.*; 23:737-752.
- Salisbury, G.W., Baker, F. N. (1966).** Nuclear morphology of spermatozoa from inbred and linecross Hereford bulls. *J. Anim. Sci.*; 25:476.
- Sánchez Belda, A. (1984).** Razas Bovinas españolas. Extensión Agraria. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. 878.
- Sánchez Belda, A. (1986).** Catálogo de razas autóctonas españolas Tomo II. Especie bovina. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Secretaria General Técnica. 224.
- Sánchez-García, L., Fernández-Rodríguez, M., Vallejo-Vicente M. (1992).** Formación de un banco de germoplasma (semen y embriones congelados) en el programa de preservación de las razas bovinas morenas gallegas. *Arch. Zootec.* 41:485-496.

Sánchez-Pena, L., Reyes, B., López-Carrillo, L., Recio, R., Moran-Martínez, J., Cebrian M., Quintanilla, V. (2004). Organophosphorous pesticide exposure alters sperm chromatin structure in mexican agricultural workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 196(1):108-113.

Sang-Myeong, L., Kleiboeker, B. (2007). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway. *Virology*; 365:419-434.

Sanz Parejo, J. (1997). Presente y futuro de la reproducción en ganado vacuno bravo. III Symposium Nacional del Toro de Lidia. Zafra. Badajoz.

Schmid T, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R. (2007). The Effects of Male Age on Sperm DNA Damage in Healthy Non-smokers. *Hum. Reprod.*; 22:180-187.

Selevan, S., Borkovec, L., Slott, V., Zudova, Z., Rubes, J., Evenson, D., Perrault S.D. (2000). Semen quality and reproductive health of young czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ Health Perspect*; 109(9):887-94.

Seli, E., Sakkas, D., Gardner, D., Schoolcraft, W., Moffatt, O. (2004). Extent of nuclear DNA damage in ejaculated spermatozoa impacts on blastocyst development after in vitro fertilization. *Fertil. Steril.*; 82:378-383.

Sergerie, M., Mieuisset, R., Croute, F., Daudin, M., Bujan, L. (2007). High risk of temporary alteration of semen parameters after recent acute febrile illness. *Fertil. Steril.*; 88(4):970.E1-970.E7.

Shannon, P., Vishwanath, R. (1995). The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. *Anim Reprod Sci.*; 39:1–10.

- Shanmugam, M., Vinoth, A., Rajaravindra, K.S., Rajkumar, U. (2014).** Evaluation of semen quality in roosters of different age during hot climatic condition. *Anim. Reprod. Sci.*; 145; 81-85.
- Sharma, R., Agarwal, A. (1996).** Sperm quality improvement in cryopreserved human semen. *J. Urol.*; 156:1008-1012.
- Sharma, N., Mohan, G. Sahni, K. L (1991).** Characteristics and cryopreservation of semen of Holstein-Friesian bulls under tropics. *Indian J. An. Sci.*; 61:977-979.
- Sharma, R. K., Said, T., Agarwal, A. (2004).** Sperm DNA damage and its clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J. Androl.*; 6(2):139-148.
- Shimada, A., Kikuchi, K., Noguchi, J., Akina, K., Nakano, M., Kaneko, H. (2000).** Protamine dissociation before decondensation of sperm nuclei during “in vitro” fertilization of pig oocytes. *J Reprod Fertil*; 120:247-56.
- Shoukir, Y.; Chardonens, D.; Campana, A.; Sakkas, D. (1998).** Blastocyst development from supernumerary embryos after intracytoplasmic sperm injection: A paternal influence? *Hum. Reprod.* 1998, 13, 1632–1637. **Simon, L., Castillo, J., Oliva, R., Lewis, S.E. (2011).** Relationships between human sperm protamines, DNA damage and assisted reproduction outcomes. *Reprod. Biomed. On line*; 23:724-734.
- Silva, A.E.D.F., Dias, A.L., Unanian, M.M., Freitas, A.R., Bloch, C.J. (2003).** Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozóides do epidídimo e ejaculado de bovinos. *Rev. Bras. Zootec.*; 32:1890-1900.
- Silva, A.E.D.F., Unanian, M.M., Cordeiro, C.M.T., Freitas, A.R. (2002).** Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. *Rev. Brasil. Zoot.*; 31(3):1157-1165.

Silva, B., Gonzalo, A., Cañón, J. (2006). Genetic parameters of aggressiveness, ferocity and mobility in the fighting bull breed. *Anim. Res.*; 55:65-70.

Silva, P., Gadella, B. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*; 65:958-978.

Singh, N., Mccoy, M., Tice, R., Schneider, E. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.*; 175(1):184-191.

Slowinska, M., Karol, H., Cieresko, A. (2008). Comet assay of fresh and cryopreserved bull spermatozoa. *Cryobiology*; 56: 100-102.

Söderquist, L., Janson, L., Haard, M., Einarsson, S. (1996). Influence of season, age, breed and some other factors on the variation in Sperm morphological abnormalities in Swedish Dairy A.I. Bulls. *Anim. Reprod. Sci.*; 44: 91-98.

Söderquist, L., Janson, L., Larsson, K., Einarsson, S. (1991). Sperm Morphology and fertility in AI bulls. *Zentralblad Veterinärmed*; 38:534-543.

Sorensen, A. Jr. (1982). Reproducción Animal. Principios y Prácticas. Ed. Mc Graw - Hill. 539.

Sotillo, J.L., Serrano, V. (1985). Producción animal I. Etnología Zootécnica Tomo I. Ed. Tebas-Flores., Madrid. 403.

Spano, M., Bonde, J.P., Hjollund, H.I., Kolstad, H.A., Cordelli, E., Leter, G. (2000). Sperm chromatin damage impairs human fertility. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Fertil. Steril.*; 73:43-50.

Specht, I.O., Hougaard, K.S., Spanò, M., Bizzaro, D., Manicardi, G.C., Lindh, C.H., Toft, G., Jönsson, B.A., Giwercman, A., Bonde, J.P. (2012). Sperm DNA integrity in relation to exposure to environmental perfluoroalkyl substances - A study

of spouses of pregnant women in three geographical regions. *Reprod. Toxicol.*; 33:577-583.

Speit, G., Hartmann, A. (1999). The comet assay (Single-cell gel test): a sensitive genotoxicity test for detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.*; 113:203-212.

Speit, G., Vasquez, M., Hartmann, A. (2009). The comet assay as an indicator test for germ cell genotoxicity. *Mut. Res.* 681:3-12.

Stout, M.A. (2012). Comparison of epididymal and ejaculated sperm collected from the same Holstein bulls .Tesis Doctoral. Universidad de Louisiana, EEUU.

Sun, J., Jurisicova, A., Casper, R. (1997). Detection of deoxyribonucleic acid fragmentacion in human sperm:correlation with fertilization in vitro. *Biol Reprod*; 56:602-607

Taylor, J.F., Bean, B., Marshall, C.E., Sullivan, J.J. (1985). Genetic and environmental components of semen production traits of artificial insemination Holstein bulls. *J.Dairy Sci.*; 68: 2703-2722

Tejada, R.I., Mitchell, J.C., Norman, A., Marik, J.J., Friedman, S. (1984). A Test For The Practical Evaluation Of Male Fertility By Acridine Orange (Ao) Fluorescence. *Fertil Steril.*; 42(1):87- 91.

Thomas, C., Garner, D., Dejarnette, J., Marshall, C. (1998). Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.*; 58(3): 786-793.

Tomlinson, M., Moffatt, O., Manicardi, G., Bizzaro, D., Afnan, M., Sakkas, D. (2001). Interrelationships between seminal parameters and sperm nuclear DNA damage before and after density gradient centrifugation: implications for assisted conception. *Hum. Reprod.*; 16(10):2160-2165.

Tremellen, K. (2008). Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. *Hum. Reprod.*; 14:243-258.

Tsakmakidis, I.A, Khalifa, T.A.A., Boscos, C.M. (2012). Age-related changes in quality and fertility of porcine semen. *Biol. Res.*; 45:381-386.

Tuli R., Schmidt-Baulain, R., Holtz, W. (1992). Computer-assisted motility assessment of spermatozoa from fresh and frozen—thawed semen of the bull, boar and goat *Theriogenology*; 38:487-490.

Unión de Criadores del Toro de Lidia (2005). Un Siglo de Toros 1905 - 2005. Ed. UCTL, Madrid. 193.

Vagini, L., Baruffi, R.L., Mauri, A.L., Petersen, C.G., Massaro, F.C., Pontes, A., Olivera J.B.A., Franco, Jr. J.G. (2007). The Effects of male age on sperm DNA damage in an infertile population. *Reprod. Biomed. Online*; 15:514-519.

Vallecillo, H.A.F. (2011). Caracterización reproductiva de toros de la raza Marismeña como base a su conservación. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba.

Van Eldik, P., EH Van Der, E.H., Waaij, E.H., Ducro, B., Kooper, A.W., Stoot T.A.E., Colenbrander, B. (2006). Possible negative effects of inbreeding on semen quality in Shetland pony stallions. *Theriogenology*; 65:1159-1170.

Vilakazi, D.M., Webb, E.C. (2004). Effect of age and season on sperm morphology of Friesland bulls at an artificial insemination centre in South Africa. *South African J. An. Sci.*; 34(1):62-69.

Virro, M., Larson-Cook, K., Evenson, D. (2004). Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) Parameters are related to fertilization, blastocyst development, and ongoing pregnancy in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection cycles. *Fertil. Steril*; 81:1289-1295.

Vishwanath, R., Shannon, P. (2000). Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim. Repro. Sci*; 62:23-53.

Wang, J.; Fan, H.C.; Behr, B.; Quake, S.R. (2012). Genome-wide single-cell analysis of recombination activity and de novo mutation rates in human sperm. *Cell*; 150, 402-412.

Ward, W., Coffey, D. (1991). DNA Packaging and organization in the mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. *Biol Reprod.*; 44(4):569-574.

Ward, W. (1993). Deoxyribonucleic acid loop domain tertiary structure in mammalian spermatozoa. *Biol Reprod.*; 48(6):1193-1201.

Ward, W., Zalensky, A. (1996). The unique, complex organization of the transcriptionally silent sperm chromatin. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.*; 6(2-3):139-147.

Wat-sum, O., Chen, H., Chow, P.H. (2006). Male genital tract antioxidant enzymes - their ability to preserve sperm DNA integrity. *Mol. Cell. Endocrinol.*; 205:80-83.

Waterhouse, K.E., Haugan, T., Kommisrud, E., Tverdal, A., Flatberg, G., Farstad, W., Evenson, D., De Angelis, P. (2006). Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. *Reprod. Fertil. Dev.*; 18:781-788.

Waterhouse, K.E., Gjeldnes, A., Tverdal, A., De Angelis, P.M., Farstad, W., Håard, M., Kommisrud, E. (2010). Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and in vitro incubation of bull semen. *Anim. Reprod. Sci.*; 117:34-42.

Watson, P.F. (1981). The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5 °C by egg-yolk lipoprotein. *J. Reprod. Fert.* 62: 483-492.

Watson, P. F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and de assessment of their postthawing function. *Repro. Fertil. Dev.*; 7:871-91.

Watson, P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Anim. Reprod. Sci.*; 60-61: 481-492

Way, A.L.; Griel, L.C., Killian, G.J. (2000). Effects of accessory gland fluid on viability, capacitation and acrosoma reaction of cauda epididymal bull spermatozoa. *J. Androl.*; 21: 213-219.

Woelders, H. (1990). Overview of in vitro methods for evaluation of semen quality. 2th Intl. Conf. Deep Freezing Boar Semen. Beltsville, MD, EEUU. 145-164.

Wykes, S., Krawetz, A. (2003). The structural organization of sperm chromatin. *J. Biol. Chem.*; 278:29471-29474.

Wyrobek, A.J., Evenson, D., Arnheim, N., Jabs, E.W., Young, S., Pearson, F., Glasser, R.L.F., Thiegmann, I., Eskenazi, B. (2006). Advancing male age increase the frequencies of sperm with DNA fragmentation and certain gene mutations, but not aneuploidies or diploidies. *Proc Natl. Acad. Sci. EEUU*; 103(25): 9601-9606

Yoshii, T., Kuji, N., Komatsu, S., Iwahashi, K., Tanaka, Y., Yoshida, H., Wada, A., Yoshimura, Y. (2005). Fine resolution of human sperm nucleoproteins by two-dimensional electrophoresis. *Mol. Hum. Reprod.*; 11:677-681.

Yu, I., Leibo, S.P. (2002). Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology*; 57: 1179-1190.

Zee, Y.P., López-Fernández, C., Arroyo, F., Johnston, S.D., Holt, W.V., Gosálvez, J. (2009). Evidence that single-stranded DNA breaks are a normal feature

of koala sperm chromatin, while double-stranded DNA breaks are indicative of DNA damage. *Reproduction*; 138:267-278.

Zini, A., Kamal, K., Phang, D., Willis, J., Jarvi, K. (2001). Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology* 58, 258-261.

Zini, A., Libman, J. (2006) Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. *Cmaj.*; 175(5):495-500.

Zini, A., San Gabriel, M., Baazeem, A. (2009). Antioxidants and sperm DNA damage: a clinical perspective. *J. Assist. Reprod. Gen.*; 26(8); 427-432.

Zubkova, E.V., Wade, M., Robaire, B. (2005). Changes in spermatozoal chromatin packaging and susceptibility to oxidative challenge during aging. *Fertil. Steril.*;84(2):1191-1198.